

Bioortogonális jelzésre alkalmas kémiai hírvivők és fluoreszcens jelzővegyületek szintézise és alkalmazása

doktori értekezés

Cserép Balázs Gergely

okleveles vegyész

Témavezető: Dr. Kele Péter

tudományos főmunkatárs

Kémia Doktori Iskola

iskolavezető: Dr. Inzelt György

egyetemi tanár

Szintetikus kémia, anyagtudomány,

biomolekuláris kémia program

programvezető: Dr. Perczel András

egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Budapest, 2015.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. Biomolekulák fluoreszcens jelölése	8
3.1.1. Spektroszkópiai fogalmak, tulajdonságok	8
3.1.2. Fluoreszcens jelzővegyületek	11
3.2. Kapcsolási lehetőségek.....	13
3.2.1. Genetikai kódolás	13
3.2.2. Nem-specifikus jelölés.....	13
3.2.3. Szelektív jelölés	13
3.3. Szelektív aminosav jelölés	14
3.3.1. Tirozin-specifikus jelölés.....	14
3.3.2. Cisztein-specifikus jelölés	15
3.4. Bioortogonális ligáció.....	16
3.4.1. Staudinger ligáció	17
3.4.2. Fotoindukált cikloaddíció	17
3.4.3. Rézkatalizált azid-alkin cikloaddíció.....	18
3.4.4. Gyűrűfeszültség által kiváltott azid-alkin cikloaddíció	18
3.4.5. Fordított elektronigényű Diels-Alder reakció.....	19
3.5. Szekvenciális jelölés	21
4. Célkitűzések	23
5. Saját eredmények	25
5.1. Cisztein-specifikus jelzővegyületek	25
5.1.1. Szintézisek	25
5.1.2. Reaktivitás és szelektivitás vizsgálatok	29
5.1.3. Szekvenciális jelölés.....	31
5.2. Reaktív tetrazinszármazékok	34
5.2.1. Szintézisek	34
5.2.2. Reaktivitás és stabilitás vizsgálatok.....	36
5.2.3. Oligonukleotid jelölés.....	43

5.3.	Lepidinium-alapú fluoreszcens jelzővegyületek.....	49
5.3.1.	Szintézisek	49
5.3.2.	Spektroszkópiai vizsgálatok	53
5.3.3.	FRET rendszer kialakítása	55
5.3.4.	Oligonukleotid fluoreszcens jelölése	60
6.	Kísérleti rész	66
6.1.	Általános	66
6.2.	Szintézisek.....	67
6.3.	Szekvenciális jelölés gélelektroforetikus vizsgálata	90
6.4.	Kinetikai vizsgálatok	91
7.	Összefoglalás	98
8.	Summary	100
9.	Köszönetnyilvánítás	102
10.	Irodalomjegyzék	103

1. Rövidítések jegyzéke

abs.	abszolútizált (vízmentesített) oldószer
CuAAC	réz(I)-katalizált azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíció (<i>copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition</i>)
Boc	<i>tert</i> -butiloxikarbonil csoport
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butil-dikarbonát (Boc-anhidrid)
DCM	diklórmétán
Δ	forralási hőmérséklet
Dau	daunomicin (daunorubicin)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DMT	dimetoxi-tritil csoport
DVS	divinil-szulfon
EDAC×HCl	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid hidroklorid sója
EDIPA	<i>N</i> -etildiizopropilamin, Hünig-bázis
EtOAc	etil-acetát
Fmoc	(9-fluorenilmetiloxi)karbonil csoport
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazin- <i>N'</i> -2-etánszulfonsav
Hex	hexán izomerelegy
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benztriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametil-urónium hexafluorofoszfát
HOBt	1-hidroxibenztriazol
HOMO	legmagasabb energiájú betöltött molekulapálya (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HRMS	nagyfelbontású tömegspektroszkópia (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
IEDDA	fordított elektronigényű Diels-Alder reakció (<i>inverse electron demand Diels–Alder reaction</i>)
IR	infravörös (fény) (<i>infra red</i>)
kumarin	2 <i>H</i> -kromén-2-on
(HP)LC-MS	tömegspektrometriás detektorral kapcsolt (nagyhatékonyságú) folyadékkromatográfia
LUMO	legalacsonyabb energiájú üres molekulapálya (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)

MS	tömegspektroszkópia (<i>mass spectrometry</i>)
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NaPi	nátrium-foszfát puffer
PBS	foszfát pufferelt, fiziológia nátrium-klorid oldat (phosphate-buffered saline)
R _f	retenció faktor
rt.	szobahőmérséklet (<i>room temperature</i>)
SPAAC	gyűrűfeszültség által kiváltott azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíción (<i>strain-promoted 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition</i>)
SPIEDAC	gyűrűfeszültség által kiváltott fordított elektronigényű Diels-Alder reakción (<i>strain promoted inverse electron demand Diels-Alder cycloaddition</i>)
TBTA	tris[<i>(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil</i>]amin
^t Bu	<i>tert</i> -butil
TEA	triethylamin
TFA	2,2,2-trifluorecetsav
THF	tetrahydrofuran
UV	ultraibolya (fény) (<i>ultraviolet</i>)
VRK	vékonyréteg-kromatográfia

2. Bevezetés

A fehérjék, oligonukleotidok és más biopolimerek kémiai jelölésére alkalmas módszerek kulcsfontosságúak a modern biotechnológiai, gyógyszerkémi és molekuláris biológiai kutatásokban.^{1,2} A zöld fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein, GFP*) felfedezése és sokrétű alkalmazhatósága (amit 2008-ban Kémiai Nobel-díjjal is jutalmaztak³) megmutatta a fluoreszcencián alapuló szelektív fehérjejelölés előnyeit a hely és a dinamikai tulajdonságok meghatározásban. A fluoreszcens fehérjéken alapuló jelzési eljárásoknak ugyanakkor megvannak a saját korlátai. Így nem alkalmazhatók fehérjék poszt-transzlációs módosításainak követésére, vagy szénhidrátok, lipidek és egyéb, a genomban nem direkt módon kódolt molekulák tanulmányozására. Ezek a korlátok kiemelik a kis, szintetikus jelzővegyületek jelentőségét. E mesterséges jelzővegyületek alkalmazásakor további előnyt jelent, hogy reaktivitásuk, valamint fotofizikai és oldhatósági paramétereik szintetikusan hangolhatóak. Jelentőségüket jól mutatja, hogy 2014-ben, részben ilyen mesterséges jelzővegyületeknek köszönhetően, a szuperfelbontású mikroszkópia terén elért fejlesztésekért ítéltek oda a kémiai Nobel-díjat.⁴

A biomolekulák natív környezetben történő, kis, szintetikus vegyületekkel való fluoreszcens módosításának leghatékonyabb módszerei az ún. *bioortogonális ligációkon* alapuló eljárások. A jelenleg ismert bioortogonális átalakítások közül a legelterjedtebbek és reakciósebességüket figyelembe véve leggyorsabbnak tekinthetők az azidok és alkinok közti 1,3-dipoláris cikloaddíciós, valamint a tetrazinok feszült gyűrűs alkinokkal / alkénnel való Diels-Alder reakciói.^{5,6} Mivel a biomolekulák térbeli szerkezetét, így fizikai-kémiai tulajdonságait nagyon érzékenyen befolyásolhatja a természetestől eltérő motívumok bevitele, ezért akár egy-egy új funkció csoport is dönthet arról, hogy a vegyület képes-e továbbra is betölteni a szervezetben természetes szerepét. Mindezek tekintetében az újfajta kapcsolódási pontokat létrehozó vagy kihasználó, a lehetőségeket bővítő jelölőmolekulák fejlesztése napjainkban is kiemelt jelentőségű.

Doktori munkám során mindkét oldalról vizsgáltam biomolekulák fluoreszcens jelölésének kérdését. Egyrészt a jelzés hatékony beviteléhez szükséges *kémiai hírvivők* fejlesztésével foglalkoztam. Ezen belül előállítottam különféle, a Cys aminosav szelektív jelölésére alkalmas vegyületeket. Szintén e témakörben vizsgáltam különböző reaktivitású és stabilitású tetrazinok és feszült gyűrűs dienofilek alkalmazási lehetőségeit. A kísérleti megfigyelések mellett elméleti

kémiai számítások segítségével is vizsgáltuk a szubsztituensek elektronikus és sztérikus hatásait.

A fluoreszcens jelzővegyületek oldaláról megközelítve a kérdéskört, olyan új, a közeli IR-tartományban emittáló, nagy Stokes-eltolódással rendelkező festékeket terveztem és állítottam elő, melyek tulajdonságaiknak köszönhetően ideálisak lehetnek *in vivo* jelölésekre és jól alkalmazhatóak Förster-típusú energiatranszfer (FRET) rendszerekben is, így kiválóan alkalmasak dinamikus folyamatok nyomon követésére.

Dolgozatomban a biomolekulák fluoreszcens jelölésének rövid összefoglalása és a jelöléshez szükséges körülmények (például aminosav-specifikus és bioortogonális reakciók) ismertetése után az aktuális kihívásokat és fejlesztési irányokat mutatom be. Ezt követően ismertetem a doktori munkám során tervezett kémiai hírvivők és fluoreszcens jelzővegyületek szintézisét, illetve *in vitro* és *in vivo* körülmények közötti alkalmazhatóságát. Munkámban (együttműködés keretében) kísérletet teszek az előállított tetrazinok kísérletileg tapasztalt reaktivitásának, valamint a fluoreszcens vegyületek esetében a megfigyelt fotofizikai tulajdonságok elméleti értelmezésére.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Biomolekulák fluoreszcens jelölése

A különböző molekulák, vagy akár egész sejtek *in vitro* vagy *in vivo*, fluoreszcens jelölése régóta elterjedt és népszerű biotechnológiai technikának számít^{1,2} főleg az alternatívákhoz (radio- vagy NMR-aktív nuklidok felhasználása) képest nyújtott előnyei miatt. Ezek közül a legfontosabbak a sejten belüli pozicionálást lehetővé tevő jó tér- és időbeli felbontóképesség, melyek terén mára 10-20 nm-es, illetve 0,1 ns-os értékek érhetőek el, valamint az igen érzékeny, akár egyetlen molekula kimutatására is alkalmas, relatíve olcsó detektálhatóság.^{7,8} Kölcsönhatások, ezáltal dinamikusan változó folyamatok vizsgálata is lehetséges több fluorofór együttes felhasználásával. Az egyes fluoreszcens jelzővegyületek között azonban jelentős különbségek lehetnek, ami akár alkalmatlanná tehet egyes jelzővegyületeket egy adott célra való felhasználásra. Ezeket a különbségeket egyrészt az egyes spektroszkópiai tulajdonságokkal jellemezhetjük, másrészt fontos tényező az adott fluorofór mérete, típusa, illetve, hogy milyen módszerrel tudjuk a vizsgálni kívánt biomolekulához kapcsolni.

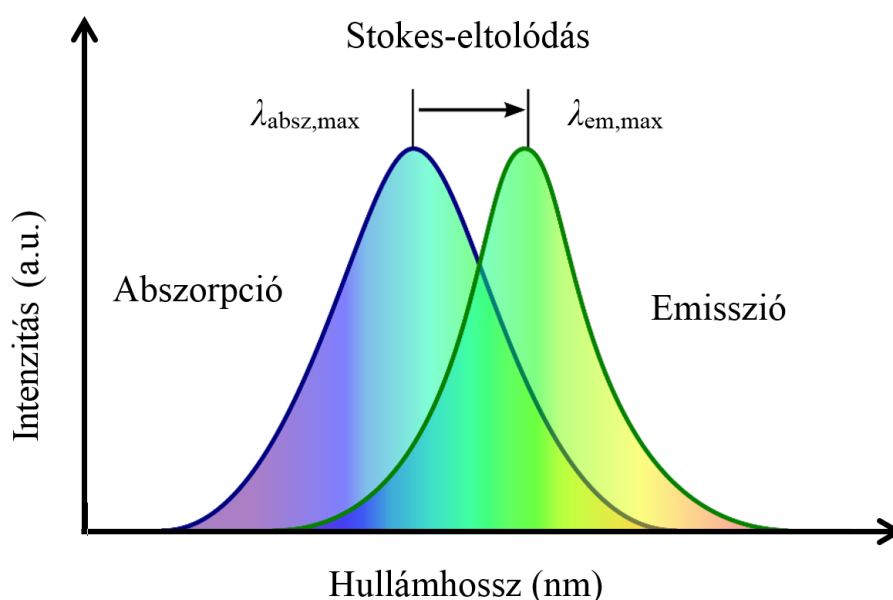
3.1.1. Spektroszkópiai fogalmak, tulajdonságok

A fluoreszcenciát, illetve az egyes fluorofórok spektroszkópiai tulajdonságait számtalan, gyakran egymással összefüggő paraméterrel jellemezhetjük. A biomolekulák fluoreszcens detektálásán alapuló képalkotó technikák esetében és a megfelelő jelzővegyületek kiválasztásakor a gyakorlatban alábbiak a legfontosabbak.

Abszorpció, gerjesztési és emissziós hullámhossz-maximumok, Stokes-eltolódás

Az abszorpció hullámhossz maximum (λ_{absz}) adja meg, hogy a fluorofórt tartalmazó mintát besugározva hol maximális az elnyelt fotonok száma. Az gerjesztési hullámhossz maximum (λ_{exc}) ezzel szemben azt mutatja meg, hogy mely hullámhossz besugárzásával érhető el a legintenzívebb fluoreszcencia. A kettő lehet azonos, ám gyakran kisebb-nagyobb eltérés mutatkozik köztük. Az előbbi ugyanis az alapállapotból a magasabb energiájú gerjesztett állapotok felé történő összes átmenetet mutatja, ezzel szemben a gerjesztési spektrumban csak azokat az átmeneteket látjuk, melyek fluoreszcens folyamatot eredményeznek. Új jelzővegyületek fejlesztésekor a gyakorlati felhasználhatóságra tekintettel két tendencia

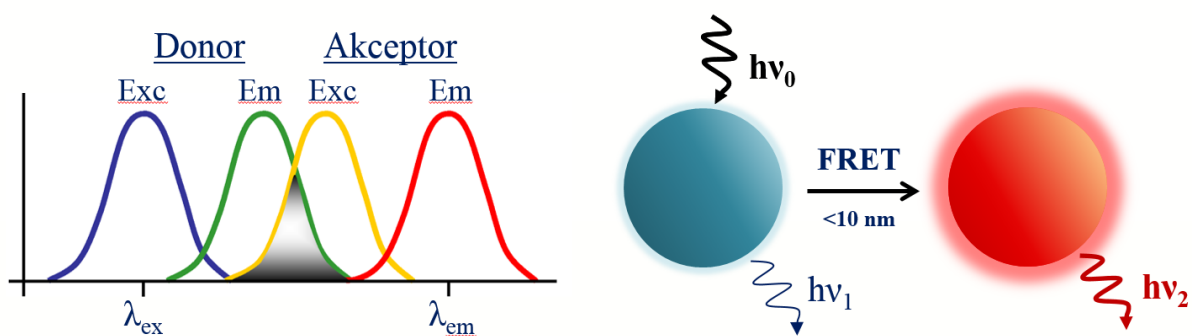
figyelhető meg. Egyfelől igyekeznek kihasználni a kereskedelmi forgalomban kapható készülékekben leggyakrabban alkalmazott nagy hatékonyságú lézerek (például dióda- és dióda-pumpált lézerek) hullámhosszát. A biológiai mintákban való előnyösebb fotofizikai tulajdonságaik miatt ugyanakkor egyre több olyan jelzővegyületet állítanak elő, melyeknek gerjesztési és emissziós hullámhossz maximumai a távoli vörös, közeli IR tartományba esnek. Ennek oka, hogy biológiai minták esetében a magasabb energiájú sugárzások egyrészt károsíthatják az élő sejteket, másrészt a bennük előforduló természetes fluorofórok gerjesztésével autofluoreszcenciát indukálnak, csökkentve ezzel a detektálás hatékonyságát. A távoli vörös – közeli IR tartomány további előnye, hogy itt a legnagyobb a szövetek fényáteresztő képessége (ún. víz-ablak⁹), így érzékenyebb detektálhatóság érhető el mélyebb rétegekből is.



1. ábra. A gerjesztési és emissziós hullámhosszak különbsége a Stokes-eltolódás.

További fontos paraméter az emissziós- és abszorpciós hullámhossz maximumok távolsága, más néven a Stokes-eltolódása (1. ábra). Nagy eltolódással bíró jelzővegyületek esetén a spektrumok átfedése minimális, így nem lép fel önabszorpció, és intenzív gerjesztés használata sem zavarja a detektálást, így nagyban javítható a jel/zaj arány. Ezen kívül, mivel a természetes, endogén fluoreszcens csoportok kis eltolódással rendelkeznek, még gerjesztésük esetén is a specifikus jel jól elkülöníthető az autofluoreszcenciából származó jeltől. Általánosságban véve a 100 nm-nél nagyobb eltolódással rendelkező (ún. mega-Stokes¹⁰) fluorofórok használata különösen előnyös FRET-rendszerekben (*Förster Resonance Energy Transfer*). Az ilyen

rendszerekben ugyanis, a donor gerjesztésekor, feltéve hogy megfelelően nagy átfedési integrállal rendelkezik a donor emissziós és az akceptor gerjesztési sávja, és a két kromofór kellően közel helyezkedik el egymáshoz ($< 10\text{ nm}$) az akceptor emissziója is megjelenik. Abban az esetben, ha mega-Stokes fluorofórokat használunk, kizárjuk az akceptor közvetlen, a donor gerjesztési hullámhosszán történő gerjesztését és az ebből származó fluoreszcenciáját (*cross-talk*) és csak a specifikus FRET jelet detektáljuk (2. ábra).



2. ábra. A FRET rendszer működése

Moláris abszorpciós koefficiens, kvantumhasznosítási tényező, fényesség

A különböző fluorofórok összehasonlíthatóságának érdekében vezették be a fényesség fogalmát, mely a moláris abszorpciós koefficiens (ϵ) és a kvantumhasznosítási tényező (Φ_F) szorzataként adható meg. Az előbbi azt adja meg, hogy egy molekula az adott hullámhosszon a besugárzott fény hányad részét nyeli el, míg az utóbbi arányszám azt mutatja meg, hogy az elnyelt fotonok hányad része az emittált fotonokénak ($\Phi_F = h\nu_{em} / h\nu_{absz}$). Ennek értelmében mindkettő tekintetében a magas érték az előnyös, azonban fontos kiemelni, hogy az alternatív relaxációs utak megjelenése miatt vízben és O_2 jelenlétében a Φ_F általában jelentősen lecsökken. A gyakorlatban már 0,001-es kvantumhasznosítási tényező fölötti érték esetén is hatékony detektálás valósítható meg, például az angiográfia során mind a mai napig használt¹¹ indocianin-zöld fluoreszcens festék 820 nm-es emisszió mellett vízben csak 0,003-as Φ_F értékkel rendelkezik.¹²

Fotostabilitás

A fluoreszcens molekulák ismétlődő gerjesztés – relaxáció ciklus során bizonyos valószínűséggel¹³ elveszíthetik fluoreszcens képességüket, ami a gyakorlati felhasználás során időben csökkenő intenzitást eredményez (*photobleaching*). A folyamat hátterében a gerjesztett állapotban lejátszódó fotokémiai reakciók állnak. Amennyiben egy biológiai folyamat vagy

molekula követése érdekében a jelzővegyület többszöri gerjesztése szükséges, a magas fotostabilitás elengedhetetlen tulajdonság.

Fluorogenicitás

A jelzővegyületek egy külön csoportját képezik a kiindulási állapotban nem, de a kapcsolási reakció során fluoreszcensé váló anyagok. Ilyen, ún. fluorogén jelölőanyagok alkalmazásával az általában feleslegben használt, el nem reagált molekulák okozta háttérfluoreszcencia ideális esetben szinte nullára csökkenthető.¹⁴ Ennek köszönhetően még feleslegben alkalmazva sincs szükség az elreagálatlan molekulák elválasztására, így használatukkal elkerülhetőek a gyakran bonyolult, mérsékelt eredménnyel járó és a sejtekre néha káros mosási lépések. Szerkezetüket tekintve elmondható, hogy fluorofór vázhoz a fluoreszcencia kioltásáért felelős csoport (*quencher*) kapcsolódik, mely a jelölési reakció során vagy lehasad, vagy átalakul, így megváltoznak a fotofizikai tényezői, ezzel lehetővé téve a fluoreszcencia megjelenését.

3.1.2. Fluoreszcens jelzővegyületek

A fluoreszcens jelzővegyületek eredetüket és felépítésüket tekintve három nagy csoportba oszthatóak: lehetnek természetesek vagy szintetikusak, ez utóbbin belül pedig szervetlen anyagból felépülők vagy szerves molekulák.

Fluoreszcens fehérjék

Bár az endogén, természetes fluorofórok (a (hetero)aromás csoporttal rendelkező molekulák pl. egyes aminosavak, nukleobázisok, porfirinek) jelenléte néhány esetben jelölésmentes fluoreszcens technikák alkalmazását teszi lehetővé, szintetikus, exogén módon bevitt jelölők esetében az autofluoreszcencia miatt inkább hátrányt jelentenek. Speciális csoportját képezik a természetes fluorofóroknak a fehérjékbe génfüzióval specifikusan bevihető, különböző színnel emittáló fluoreszcens fehérjék (GFP és különféle színű származékai).¹⁵ Előnyük, hogy géntechnológiai úton szinte bármilyen vizsgálni kívánt fehérjéhez hozzáfűzhetőek. Korlátaik, hogy nem alkalmazhatók poszt-transzlációs módosítások követésére, vagy lipidek és egyéb, a genomban nem direkt módon kódolt molekulák tanulmányozásakor. További hátrányuk, hogy nagy méretüknél fogva (jellemzően >25 kDa) perturbálhatják a rendszert, így a vizsgálni kívánt fehérje esetleg nem fogja tudni betölteni biológiai funkcióját vagy megváltoznak lokalizációs tulajdonságai.¹⁶

Lumineszcens nanorészecskék

Számos, mesterségesen előállított nanorészecske rendelkezik eredendő fénykibocsátási képességgel, tehető lumineszcenssé megfelelő ritkaföldfémekkel való módosítással, vagy hordozóként funkcionálva feltölthető fluoreszcens kismolekulákkal.¹⁷ A biológiai szempontból legrelevánsabb, már alkalmazásba került típusok a félvezető nanorészecskék (*quantum dots*, QDs) és polimerek, a fluoreszcens nanogyémántok, anti-Stokes emisszióra képes szervesetlen nanokompozitok (*upconverting nanoparticles*, UCNPs) és a feltölthető szilika nanogyöngyök. Ezek vagy nem toxikusak, vagy szilika borítással biokompatibilissá tehetőek, méretükkel és felépítésükkel fluoreszcens tulajdonságaik széles tartományban változtathatóak, illetve kimagasló fényességgel és fotostabilitással bírnak. Hátrányuk a nehezkesebb előállításban és a kismolekulákhoz képest nagyobb méretükben keresendő (jellemzően 100 – 200 nm, bár már vannak 20-30 nm-esek is).

Szerves kismolekulák

A legszélesebb körben változtatható reaktivitású, fotofizikai és fizikai-kémiai tulajdonsággal a szerves fluoreszcens kismolekulák bírnak. A szubsztituensek finomhangolásával jól befolyásolható polaritásuk, és bizonyos tartományon belül gerjesztési és emissziós hullámhosszuk is. Fő előnyük ennek köszönhetően, hogy mindig az adott problémához leginkább megfelelő jelzővegyület választható, illetve kis méretükből adódóan várhatóan ezek okozzák a legkisebb változást a megfigyelni kívánt rendszerben. A legmodernebb fluorofórokkal szembeni elvárás, hogy több előnyös tulajdonságot egyesítsenek magukban, mint például a fotostabilitás, membránpermeabilitás, nagy fényesség, távoli vörös – közeli IR tartományban való emisszió, minél kisebb aspecifikus kötődés, nagy Stokes-eltolódás vagy a fluorogén tulajdonság.

3.2. Kapcsolási lehetőségek

Az egyes fluoreszcens jelzővegyületeknek a vizsgálni kívánt biomolekulához való kapcsolása többféle úton, illetve ezek kombinációjával is történhet.

3.2.1. Genetikai kódolás

A fluoreszcens fehérjék genetikai kódjának a vizsgálandó fehérjéhez való hozzáfűzésével a sejtek saját transzkripció/transzláció apparátusa használható fel a jelzés beépítésére. Szintetikus kismolekulák esetében ún. STOP-kodon (amber) szupresszió segítségével építhetők be nem-természetes aminosavszármazékok, fehérje- és helyspecifikusan. Ehhez először a jelzővegyület aminosavszármazékát kell előállítani. Ezt követően egy megfelelő ún. ortogonális aminoacil-tRNS – tRNS szintáz párral a STOP kodon „értelmessé tételével” a kívánt aminosav beépíthető az adott fehérje egy célzott pontjára.¹⁸ A látszólag nehéz megvalósíthatóság (megfelelő ortogonális szintáz párok megtalálása, gyakran irányított mutációval való mesterséges evolúciója) ellenére a módszer igen elterjedt mára, nagy előnye, hogy bármely (közvetlenül kódolt) fehérje bármely pontjára beépíthető a jelzést hordozó, vagy speciális funkciós csoporttal rendelkező aminosav.

3.2.2. Nem-specifikus jelölés

Izolált vagy mesterségesen előállított biomolekulák módosítása történhet hagyományos kémiai reakciók segítségével. Erre a legtöbbször előforduló példa peptidek nem-specifikus jelölése az *N*-terminálison, vagy reagensek számára hozzáférhető lizin aminosavak esetén annak oldalláncán, különféle amin-reaktív jelzővegyületek segítségével (pl. aktív észterek, izotiocianátok). Fehérjék esetében szintén a kitüntetett reaktivitással bíró C- vagy N-terminális jelölhető meg.^{19,20} Hátrány, hogy szelektivitás hiányában *in vivo* körülmények között nem alkalmazhatóak e módszerek, illetve az izolált, majd megjelölt fehérjék nem mindig jutnak el a sejten belüli rendeltetési helyükre.

3.2.3. Szelektív jelölés

Egyetlen biomolekula *in vivo* körülmények közötti szelektív jelölése egyedi, ritka motívumok, vagy kémiaiilag egyedi funkciós csoportokon keresztül valósítható meg. Előbbi

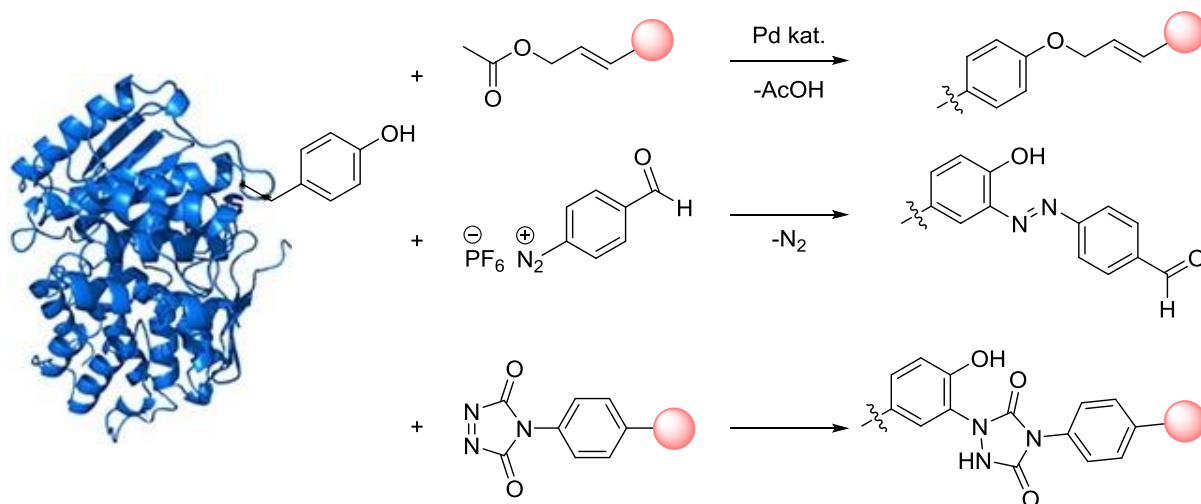
csoportba tartoznak a fluoreszcensen jelzett antitestek, melyekkel érzékeny és specifikus kimutatás érhető el, azonban ezekkel csak sejtfelszíni képletek vagy élőlt sejtek intracelluláris jelölése kivitelezhető. Kémiaiilag egyedi funkciós csoportoknak a fehérjék felszínén szabadon, azaz hozzáférhető helyen ritkán előforduló aminosavak (például tirozin, triptofán, cisztein) vagy mesterséges építőelemek (cukrok, lipidek, peptidek, nukleinsavak) beépítésével bevitt egyedi (nem-természetes) elrendeződésű természetes funkciók (pl. Cys₄-Tag), vagy szervezetedegen (pl. bioortogonális) csoportok tekinthetők.

3.3. Szelektív aminosav jelölés

Egy adott aminosavval specifikusan reagálni képes jelölőmolekulák két szempontból is fontosak. Egyrészt a kisebb fehérjék vagy epitóp peptidek fizikai - kémiai tulajdonságait nagyban befolyásolhatja akár egy láncvégi nagyobb fluoreszcens csoport vagy egy további beépített aminosav is, ilyenkor jelenthet megoldást a lánc egy másik részén történő jelölés, amihez viszont csak az ott elhelyezkedő csoportok használhatóak fel. A másik felhasználási lehetőségük az élő környezetben, fehérjék felszínén, azaz hozzáférhető helyen ritkán előforduló aminosavak szelektív jelölése. Az irodalomban eddig tirozin²¹⁻²⁵ és cisztein^{26,27} *in vivo* körülmények közötti specifikus módosítására alkalmas reakciók kerültek publikálásra.

3.3.1. Tirozin-specifikus jelölés

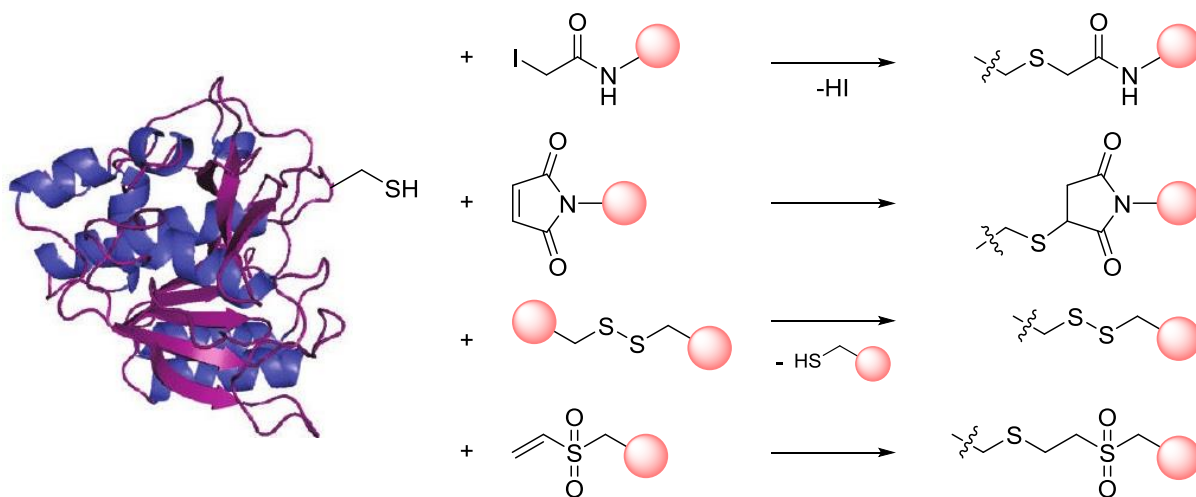
Tirozin, mint az egyik legritkábban előforduló aminosav szelektív jelölését elsőként Tilley és Francis valósította meg. Eljárásukban a Tsuji-Trost reakciót alkalmazták a Tyr fenolos hidroxil csoportjának szelektív módosítására allil-acetát típusú vegyületek és palládium katalizátor felhasználásával. A reakciókörülmények finomhangolásával elérték, hogy a kapcsolás vizes közegben, specifikusan csak fenolos hidroxil csoportokkal játszódjon le még alifás –OH (pl. szerin) vagy –NH₂ (lizin) csoportok jelenlétében is (3. ábra, felül).²¹ Ennek az eljárásnak az ötletét továbbfejlesztve Ma és Li a közelmúltban egy, a közeg polaritására érzékeny jelölőmolekulát állított elő, melynek segítségével képesek voltak a fehérje aktív centrumának térbeli változásait nyomon követni,²² kutatócsoportunk pedig a tirozin szekvenciális jelölésére dolgozott ki hasonló elven működő eljárást.²⁴ Alternatív, fém katalizátort nem igénylő megközelítésként a Barbas csoport megmutatta, hogy a tirozin közvetlenül az aromás gyűrűjén keresztül is jó hatásfokkal módosítható stabil 4-formilbenzodiazónium sók segítségével²³ (3. ábra, középen), vagy 3*H*-1,2,4- triazolin-3,5(4*H*)-dion származékokkal (3. ábra, alul).²⁵



3. ábra. Lehetséges tirozin-specifikus jelölési módszerek

3.3.2. Cisztein-specifikus jelölés

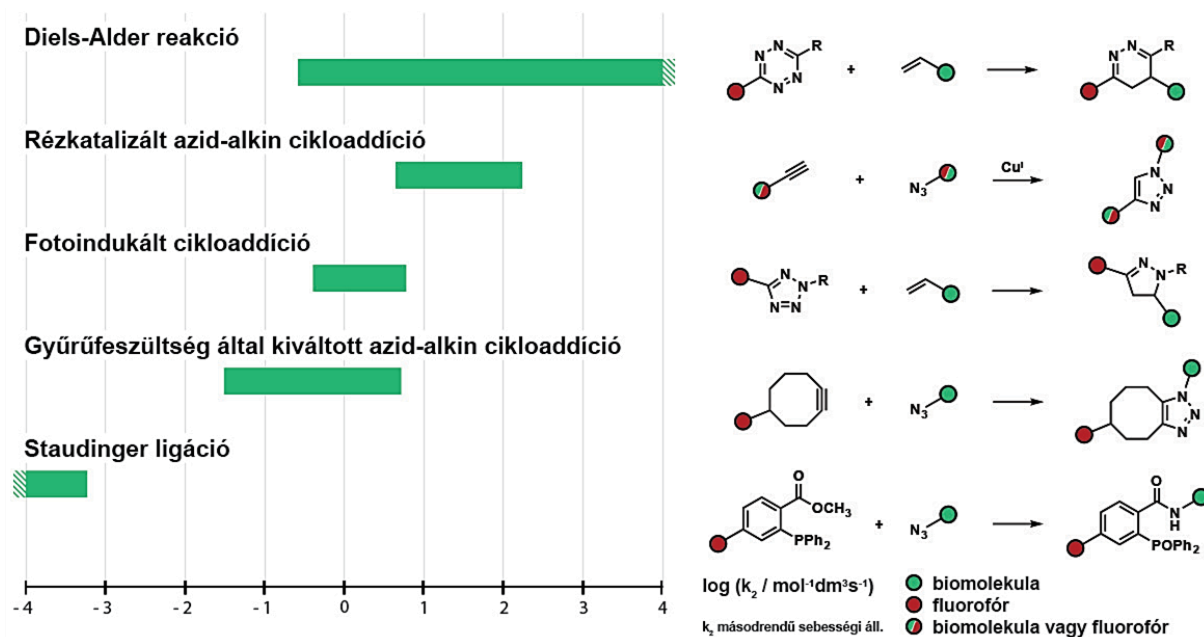
A cisztein, mint az egyik legritkább aminosav kiváló lehetőséget nyújt a szabad tiol csoportot elérhető helyen tartalmazó fehérjék szelektív megjelölésére. A széles körben alkalmazott módszerek²⁸ (pl. direkt alkilezés jóddacetammiddal, diszulfid-csere, vagy a leggyakrabban használt maleimiddal való Michael-addíció) hátrányainak²⁹⁻³¹ kiküszöbölésére ígéretes megoldásnak tűnik a vinil-szulfonokkal történő Michael-addíció (4. ábra).³² A közelmúltban Santoyo-Gonzales és munkatársai mutattak be ilyen típusú reagenseket használó fluoreszcens jelzés és immobilizálási eljárásokat.²⁶ A reakció fő előnyei, hogy az eddig tapasztalatok alapján fiziológiai körülmények között is gyors, ciszteinre szelektív (lizinnel való reakciója sokkal lassabb³³) és a vinil-szulfon-tartalmú reagensek stabilabbak és jobban oldódnak vízben, mint maleimid analógjaik.



4. ábra. Hagyományos cisztein-jelölési technikák és a vinil-szulfonnal való reakció.

3.4. Bioortogonális ligáció

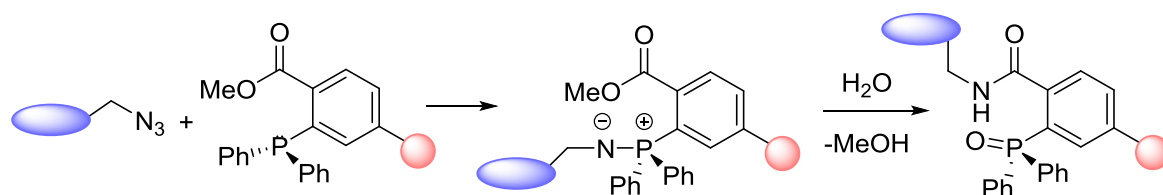
Biomolekulák élő rendszerekben történő módosítására a leghatékonyabb módszerek a bioortogonális ligációkon alapuló eljárások. A „bioortogonális” elnevezés az irodalomban először 2003-ban tűnt fel,³⁴ bár Bertozzi és Saxon már 2000-ben megfogalmazta a bioortogonális reakciókkal szembeni elvárásokat.³⁵ Ezek szerint egy bioortogonális reakcióban két biokompatibilis, nem-természetes funkciós csoport fiziológiás körülmények között lejátszódó nagy hatékonyságú, gyors és egymásra nézve szelektív (*ortogonális*) reakciója révén stabil kovalens kötés jön létre biokompatibilis termékeket eredményezve. A rendelkezésünkre álló lehetséges kémiai reakciók és átalakítások közül csak néhány felel meg ezeknek az elvárásoknak, vagy azok nagy részének. Az eddig leírt, bioortogonális ligációra alkalmas reakciók^{5,36} közül öt terjedt el és nyert széles felhasználást (5. ábra)



5. ábra. A legelterjedtebb bioortogonális reakciók és jellemző sebességi állandóik

3.4.1. Staudinger ligáció

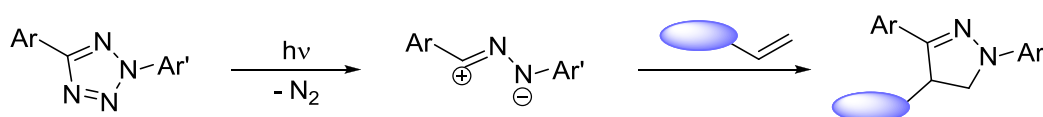
Az azidok foszfánokkal való reakcióján, más néven a Staudinger-redukción alapuló ligációs eljárást Saxon és Bertozzi dolgozta ki.³⁵ A hagyományosan használt trifenil-foszfán egyik aromás gyűrűjére elektrofil csapdaként észter csoportot helyezve a reakcióban keletkező aza-
ilid intermedier vizes közegben történő átrendeződése során amid-kötés és foszfán-oxid
képződik, miközben alkohol lép ki (6. ábra). A reagensek biokompatibilisek, hátrány viszont a
viszonylag alacsony reakciósebessége ($k_1 = 0,4 \text{ s}^{-1}$ és k_2 csak $\sim 10^{-4} - 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) és az a tény,
hogy a foszfánszármazék spontán is oxidálódik, ezáltal rontva a jelölés hatékonyságát.^{37,38}



6. ábra. A Staudinger ligáció.

3.4.2. Fotoindukált cikloaddíció

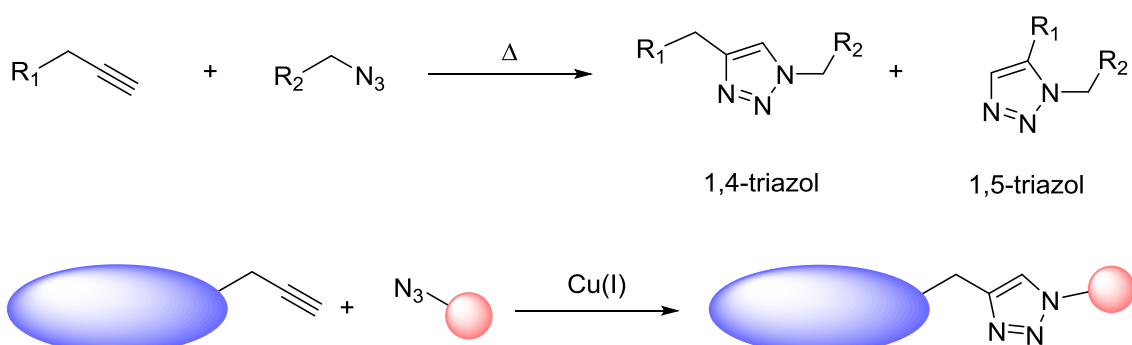
Az elsőként Huisgen és Sustmann által megfigyelt,³⁹ alkének és tetrazolok fotoindukált cikloaddíciójából Lin és munkatársai fejlesztettek bioortogonális ligációra alkalmas eljárást.^{40,41} A reakció során UV fény hatására a diaril-tetrazolból nitrogénvesztéssel kialakuló reaktív dipólus nitrilimin és a megfelelő alkén között 1,3 dipoláris cikloaddíció játszódik le (7. ábra). A reakció legnagyobb előnyei, hogy szelektíven és gyorsan ($k_2 = 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nagyságrendű sebességi együttható is elérhető), csak adott hullámhosszú fénnel való besugárzás hatására játszódik le a célzott területen.⁴² Fontos kiemelni, hogy a kialakuló pirazolinszármazék a kiindulási anyagokkal ellentétben fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkezik, így a módszer inherens fluorogén tulajdonsággal bír.⁴³ A legnagyobb hátrány, a nagyenergiájú UV-besugárzás szükségességének kiküszöbölésére jelenleg is folynak kutatások, melynek részeként az aktiváló fény vörös tartomány felé eltolása a cél.^{44,45}



7. ábra. A fotoindukált 1,3-dipoláris cikloaddíció

3.4.3. Rézkatalizált azid-alkin cikloaddíció

A Staudinger ligációhoz hasonlóan a rézkatalizált 1,3-dipoláris cikloaddíció (*Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*, CuAAC) is az azid funkciós csoportot használja ki és viszi reakcióba terminális alkinszármazékokkal. Az ugyancsak Huisgen nevéhez köthető⁴⁶, hagyományosan melegítés mellett bekövetkező és vegyesen 1,4- és 1,5-diszubsztituált triazolokat eredményező reakciót (8. ábra, felül) Sharpless⁴⁷ és Meldal⁴⁸ közel egy időben tett felfedezése tette a klikk-kémia és a bioortogonális kémia egyik alapkövévé. A két kutató megfigyelte, hogy a reakció Cu(I) katalizátor jelenlétében szobahőmérsékleten, akár vizes közegben is gyorsan lejátsszódik. A $k_2 \sim 10^1 - 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nagyságrendű sebességi állandóval jellemezhető reakció külön érdekessége, hogy a Cu(I) katalizátor jelenlétében kivitelezett cikloaddíció kizárólag az 1,4-regioizomert adja (8. ábra, alul). A biológiai rendszerekre, illetve élő sejtekre jellemző extrém kis azid- és alkin előfordulás tovább növeli a módszer felhasználhatóságát és bioszelektivitását. Élő rendszerekben azonban problémát jelent a Cu(I) citotoxicitása⁴⁹, mely kiküszöbölhető olyan új ligandumok felhasználásával melyek csökkentik a fémionok szükséges mennyiségét⁵⁰ és toxikusságát.⁵¹

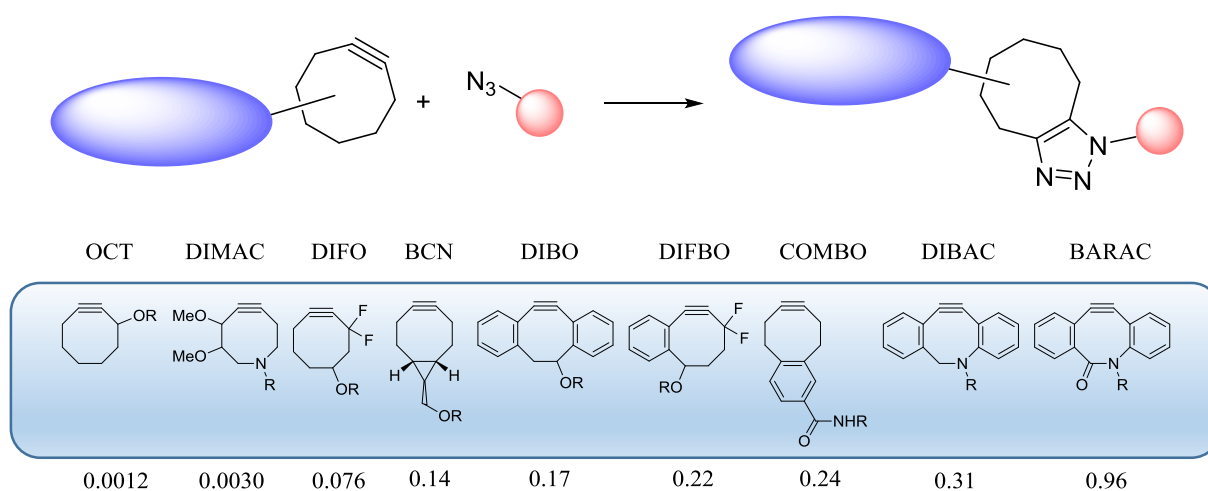


8. ábra. A hagyományos és a Cu(I)-katalizált alkin-azid 1,3-dipoláris cikloaddíció

3.4.4. Gyűrűfeszültség által kiváltott azid-alkin cikloaddíció

Elsőként Bertozzi kutatócsoportja,^{52,53} majd Boons és munkatársai⁵⁴ mutatták meg a katalizátor teljes elhagyhatóságának lehetőségét a terminális alkin ciklooktinra való cserélésével (9. ábra). Ebben az esetben a gyűrűfeszültség többletenergiája, valamint a feszült gyűrű szerkezeti torzulásaiból adódó, az átmeneti állapotot közelítő elrendeződése az, ami lehetővé teszi, hogy a reakció katalizátor hiányában is szobahőmérsékleten lejátsszódjon (*Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition*, SPAAC). Bár a réz hiányában elvész a regioszelektivitás,

ez általában nem jelent problémát a ligációs eljárások során. Nagyobb hátrányt jelentett a jelentősen lecsökkent reakciósebesség, melynek növelésére elektronszívó csoportok (a LUMO energia csökkentése révén) vagy sp^2 -hibridállapotú C-atomok beépítésével (a gyűrűfeszültség további növelésére) nyílik lehetőség. Az elmúlt évtizedben több ciklooktinszármazékot írtak le az irodalomban (8. ábra), melyek közelítették a rézkatalizált folyamat sebességét. Végül mind reaktivitás, mind stabilitás tekintetében legjobbnak a fuzionált benzol vagy ciklopropán gyűrűket tartalmazó változatok bizonyultak,⁵⁵ melyekkel a kezdeti $k_2 = 1,2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -es sebességi állandót $k_2 \sim 10^{-1} - 10^0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -re sikerült javítani (9 ábra, alul).

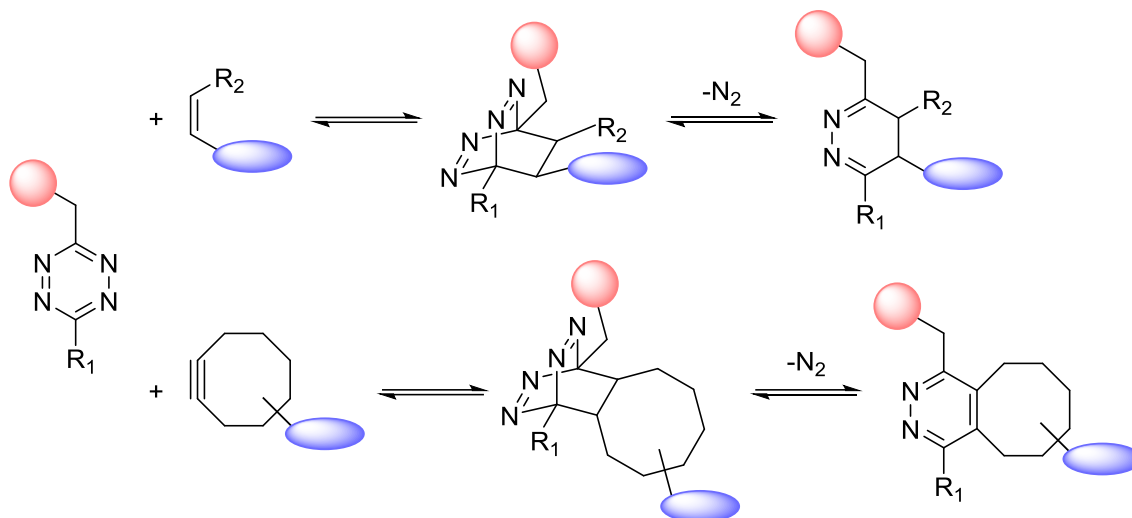


9. ábra. A gyűrűfeszültség által kiváltott azid-alkin cikloaddíció és a lehetséges ciklooktinszármazékok jellemző sebességi állandóikkal ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁵

3.4.5. Fordított elektronigényű Diels-Alder reakció

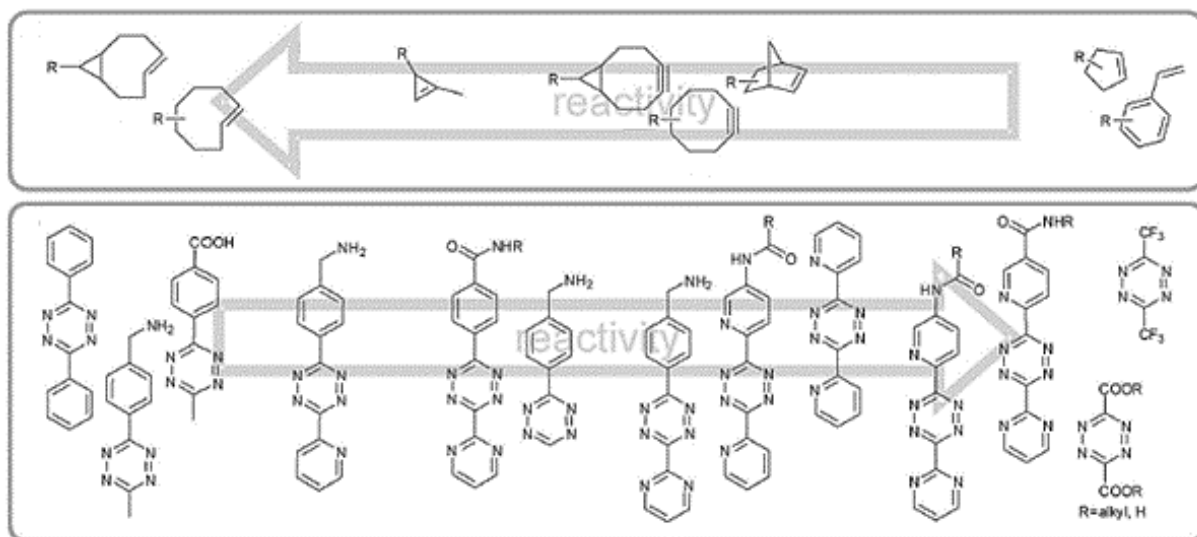
A bioortogonális kémia egyik igazi áttörését a tetrazinokra épülő, fordított elektronigényű Diels-Alder reakció fejlődése hozta el (*Inverse Electron Demand Diels-Alder reaction*, IEDDA). Az elsőként Hantzsch és Lehmann által előállított⁵⁶ 1,2,4,5-tetrazin, vagy más néven *s*-tetrazin a 3 lehetséges alapváz közül az egyetlen, amelyik stabil. A gyűrű aromás stabilizációval rendelkezik, melynek energiája szemiempirikus és *ab initio* számítások alapján⁵⁷ kisebb, mint a benzol vagy más, kevesebb nitrogént tartalmazó hattagú rendszerek esetében. A gyűrű nagy reakciókészsége annak elektronhiányos karakteréből ered, melynek köszönhetően a diénekhez hasonlóan szívesen lépnek cikloaddíciós reakcióba. Elsőként Carboni és Lindsey számolt be⁵⁸ 1959-ben fluoroalkil-tetrazinok és alkinek, illetve egyszerű olefinek közti [4+2]-es cikloaddíciós reakciókról, melyben nitrogéngáz kilépése közben piridazin, vagy a kiindulási olefin szubsztituenseitől függően dihidropiridazin-származék keletkezett. A reakció

mechanizmusára Sauer és munkatársai tettek javaslatot és bizonyították⁵⁹ kinetikai vizsgálatok alapján a fordított elektronigényű Diels-Alder reakcióként való leírhatóságát (10. ábra).



10. ábra. Tetrazinok Diels-Alder reakciója alkénnel és cikloalkinekkal

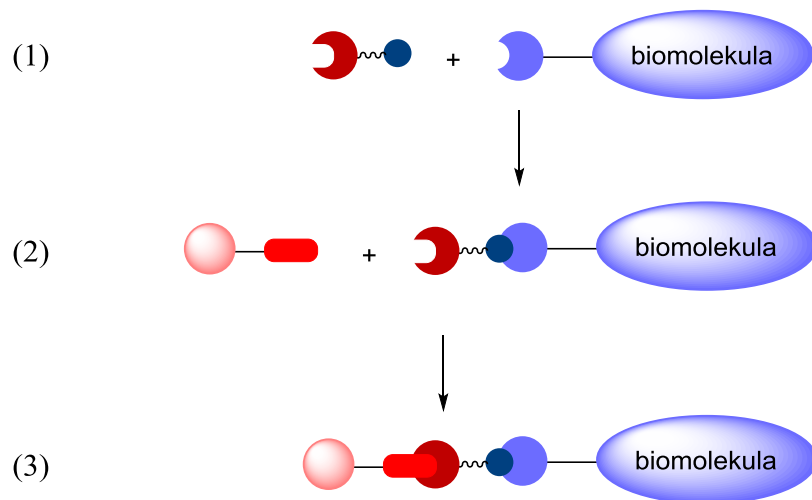
A reakció első bioortogonális alkalmazását először 2008-ban Fox és munkatársai írták le.⁶⁰ Még ugyanabban az évben Weissleder és Hilderbrand elvégezte az első ilyen reakción alapuló élő sejtes jelölést,⁶¹ azóta pedig rohamos fejlődés indult meg a területen a reakciósebesség növelésének érdekében. A dienofil partner reaktivitása a telítetlen kötés feszült gyűrűbe építésével növelhető (norbornén, ciklooktin, ciklopropén, *transz*-ciklooktén sorrendben), a tetrazin reakciókészsége pedig, szubsztituensek segítségével a gyűrű elektronhiányosságának (LUMO energiájának) módosításával hangolható⁶² (11. ábra). Mindezek eredményeképpen a gyűrűfeszültség által kiváltott reakció (*Strain Promoted Inverse Electron Demand Diels-Alder Cycloaddition*, SPIEDAC) képében egy szinte tökéletes bioortogonális eljárás bontakozott ki, melynek minden komponense biokompatibilis, az eddig leggyorsabb reakciósebességgel rendelkezik (általában $k_2 \sim 10^1$ - $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, de leírtak már $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nél nagyobb értéket is^{62,63}), valamint a hidrofób hatásnak köszönhetően vizes közegben gyorsul a reakció szerves oldószerekhez képest.⁶⁴⁻⁶⁶ Fontos azonban megjegyezni, hogy a tetrazinok reaktivitása és stabilitása kényes egyensúlyban áll egymással. Túlságosan elektronszegény gyűrű (például észter, amid vagy trifluorometil szubsztituens) esetében fiziológiás körülmények között hamarabb reagálnak vízzel (gyakorlatilag elbomlanak), mint a választott dienofillel.



11. ábra. Különböző dienofilek és tetrazinok relatív reaktivitási sora.⁶²

3.5. Szekvenciális jelölés

A bioortogonális ligációs eljárások kétlépéses, szekvenciális eljárást követnek, melynek során a célvegyületet először egy bioortogonális funkciós csoporttal ellátott hírvivő molekulával (*chemical reporter*) módosítjuk, majd az így kapott, mesterségesen funkcionáliszt specieszeket egy második lépésben reagáltatjuk a komplementer bioortogonális csoporttal ellátott jelzővegyülettel⁶⁷ (12. ábra). A kémia hírvivő beépítésére több módszer is kínálkozik.⁶⁸ Fehérjék esetében a korábban már a tárgyalt lehetőségek állnak most is rendelkezésre. Így például lehetőség van *in vitro* C- vagy N-terminálison való előzetes módosításra, ritka aminosavakon (Cys, Tyr) történő bevitelre, vagy mesterséges aminosavak genetikai kódolására.⁶⁹ Kevesebb lehetőség adódik lipidek,⁷⁰ cukrok⁷¹, zsírsavak⁷² és nukleinsavak bioortogonalizációjára. *In vivo* körülmények között csupán a sejtek saját anyagcserefolyamatának kihasználása lehetséges, melynek során a módosított biomonomerek a táptalajból való felvétel után statisztikusan kerülnek beépítésre. Ez a módszer azonban csak kisméretű csoportok beépítését teszi lehetővé (például azid vagy alkin), ugyanis a metabolikus apparátusnak továbbra is fel kell tudni ismernie az adott építőelemet.



12. ábra. A szelektív kémiai módosításon (1→2) alapuló szekvenciális jelölés.

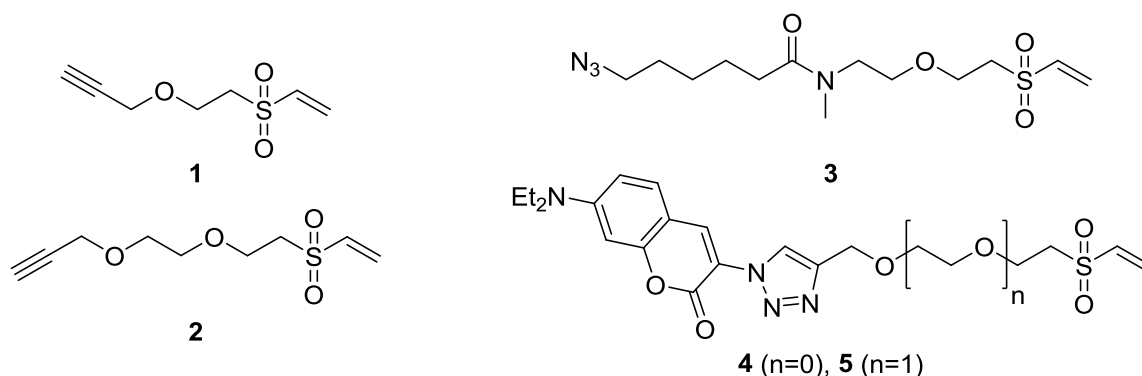
A szekvenciális eljárás számos előnnyel rendelkezik:

- A kémiai hírvivő méretéből adódóan nagy valószínűséggel kevésbé befolyásolja a peptid vagy fehérje harmadlagos szerkezetét, membránpermeabilitását, funkciójának betöltését és egyéb tulajdonságait.
- Fluoreszcens egységgel ellátott jelzővegyületekhez képest a kis hírvivő molekulával nehezebben hozzáférhető aminosavak is módosíthatóak
- A kémiai hírvivőhöz tetszőleges fluorofór kapcsolható a legalkalmasabbnak választott bioortogonális ligációs módszerrel.

4. Célkitűzések

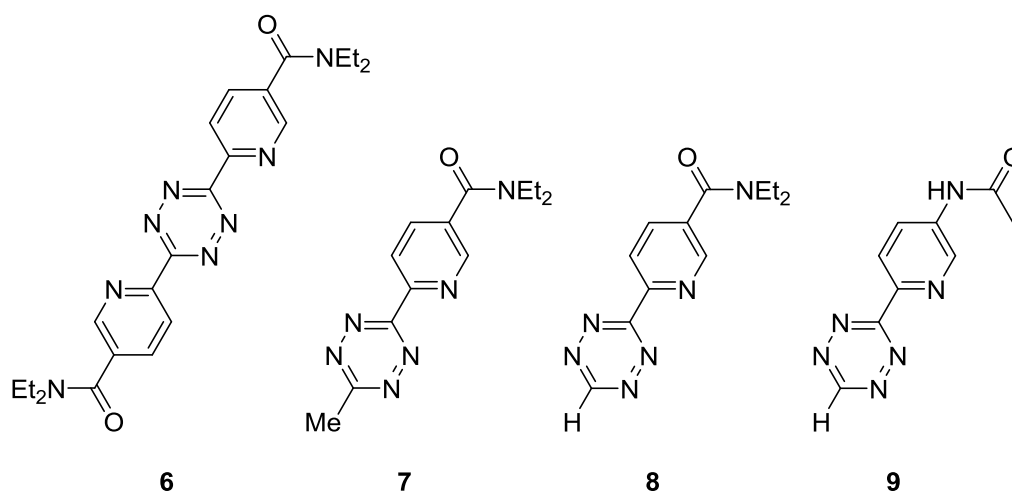
Kutatásaink során a fluoreszcens jelzés bevitelére alkalmas bioortogonális ligációs eljárások mindhárom elemét fejleszteni kívántuk. Ezért célul tűztük ki a szekvenciális jelöléshez szükséges új kémiai hírvivők, bioortogonális reagensek és mega-Stokes fluorofórok fejlesztését.

A kémiai hírvivők terén ciszteinre specifikus, vinil-szulfon motívumra épülő, alkin (**1**, **2**) vagy azid (**3**) csoportot hordozó bifunkciós, vagy fluoreszcens vázat tartalmazó vegyületek (**4**, **5**) előállítását terveztük (13. ábra). Ezek segítségével a Michael reakció fiziológias körülmények közötti szelektivitását és a reakciósebesség pH-függőségét kívántuk vizsgálni, valamint terveztük a szekvenciális jelölés során, ideálisan megválasztott azid-tartalmú fluorofórokkal fluorogén jelzés megvalósítását.



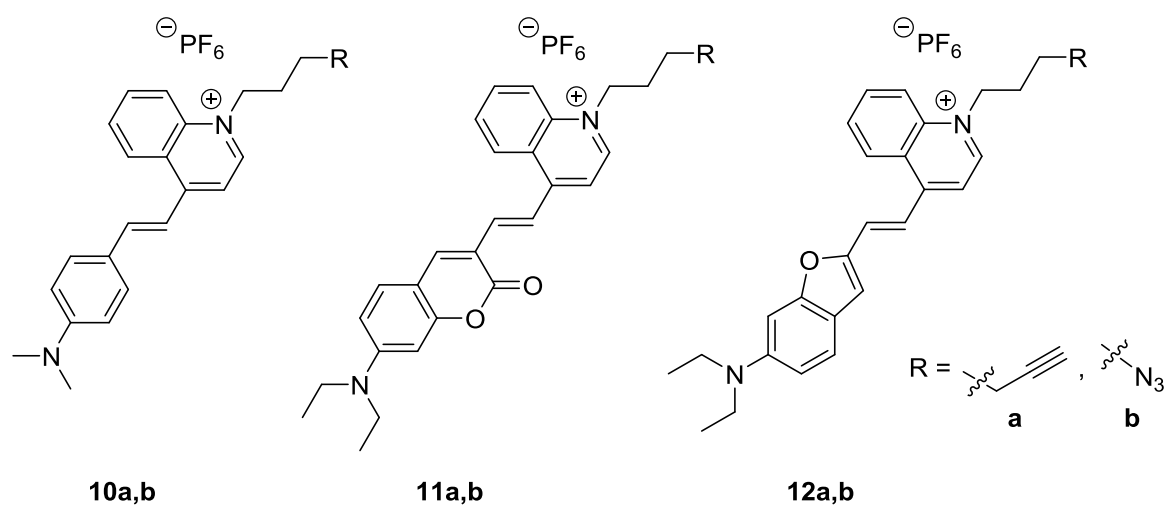
13. ábra. A tervezett vinil-szulfon-tartalmú bifunkciós hírvivők és jelzővegyületek.

Munkám másik részeként tetrazin reagensek fejlesztése során célunk azok reakciókészségének növelése volt a még elfogadható stabilitás megőrzése mellett. A reaktivitás/stabilitás arányt nikotinsav-alapú szubsztituens felhasználásával terveztük befolyásolni (14. ábra), illetve az erős elektronszívó csoport elhagyásával az elektronikus aktiválás és a szterikus gátlás viszonyát kívántuk vizsgálni.



14. ábra. A tervezett tetrazinszármazékok.

Kutatócsoportunk régóta foglalkozik bioortogonális funkcióval ellátott ún. mega-Stokes fluorofórok fejlesztésével^{73,74} és FRET rendszerekben való alkalmazhatóságának vizsgálatával.⁷⁵ E kutatások eredményeként a látható hullámhossz-tartományban emittáló fluoreszcens jelzővegyületeket fejlesztettek. Doktori kutatásaim harmadik témájaként a távoli vörös – közeli IR tartományban emittáló fluorofórok szintézise volt célunk, melyek ideálisan használnák ki az élő szövetek ún. víz-ablakát. Ezt a korábbi, alkin vagy azid funkcióval ellátott alapvázak konjugált rendszerének kiterjesztésével terveztük megvalósítani (15. ábra). További célunk volt az így kapott jelzővegyületek alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata pl. oligonukleotidok jelölésében, vagy FRET rendszerek kialakításában.



15. ábra. A tervezett fluoreszcens jelzővegyületek.

5. Saját eredmények

A kutatásaim során elért eredményeket a célkitűzések szerint megfogalmazott három nagy témakör szerint külön-külön fejezetben mutatom be. E fejezeteken belül elsőként az egyes célvegyületekhez vezető szintéziseket ismertetem. Ezt a jellemző tulajdonságaik meghatározása (például szelektivitás, reaktivitás, fluoreszcencia) követi. Végezetül a gyakorlati felhasználhatóságot igazoló példákat és *in vitro* kísérleteket mutatom be, majd pedig értékelem és összefoglalom az elért eredményeket.

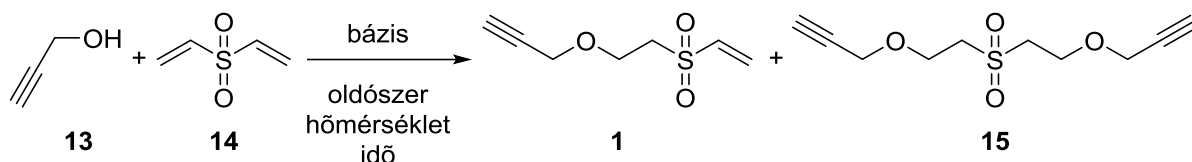
5.1. Cisztein-specifikus jelzővegyületek

5.1.1. Szintézisek

A ciszteinre specifikus bifunkcionális kémiai hírvivők megtervezésekor a legfontosabb tulajdonságok a következők voltak: jó vízdékonyság, stabilitás, az aminosavval szembeni hatékony, gyors és szelektív reakciókészség. Választásunk ezért egyrészt a kiváló tulajdonságokat mutató vinil-szulfonokra esett. Bioortogonális funkciós csoportnak a kisméretű és szekvenciális jelölési eljárásban fluorogén festékkel módosítható alkin motívumot választottuk., mely könnyen jelölhető fluorogén azidokkal.

Az **1** célvegyület tervezésekor a lehető legkisebb méret, valamint a gyors és egyszerű előállíthatóság vezérelt bennünket. A vízdékonyság növelése végett azonban célunk volt ennek etilén-glikollal bővített származékának előállítása is (**2**).

Az **1** vegyület előállítása során propargil-alkoholt (**13**) reagáltattunk divinil-szulfonnal (DVS, **14**), bázis jelenlétében (16. ábra). Az eljárás alapjául Morales-Sanfrutos munkája szolgált, azonban a mono-addíciónál termék jobb hozamú előállítása érdekében a körülményekem változtatni kellett.



16. ábra. Vinil-szulfon reakciója propargil-alkohollal bázis jelenlétében

Az optimalizálás során változtattuk a kiindulási anyagok arányát, a bázis minőségét (NaH és ^tBuOK) és mennyiségét, az oldószert (vízmentes THF és DMF), és a hőmérsékletet. A reakciókat minden esetben inert védőgáz alatt, az alkohol elfogyásáig folytattuk, melyet vékonyréteg-kromatográfiásan (VRK) követtünk. Az eredményeket és tapasztalatokat az 1. táblázat foglalja össze.

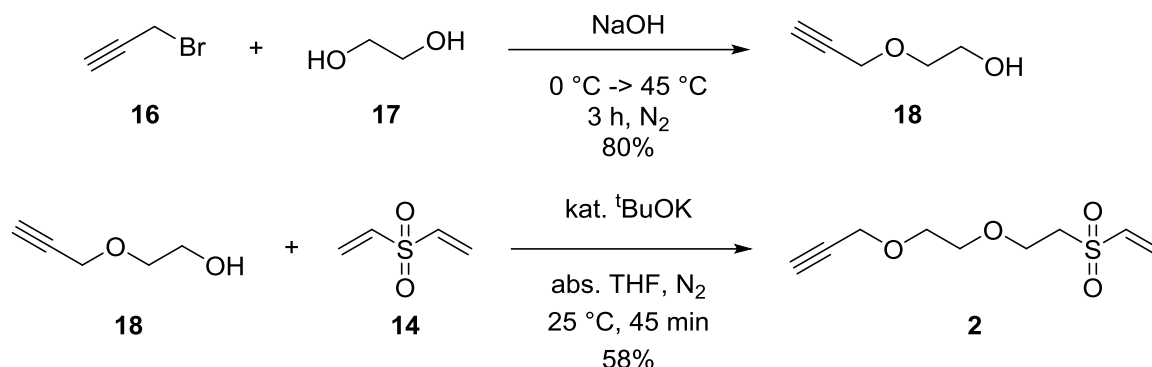
	14	Bázis	Oldószer	Hőmérséklet	Kitermelés/eredmény
1.	1,5 ekv.	0,25 ekv. ^t BuOK	abs. THF	rt.	főként 15
2.	4,0 ekv.	0,25 ekv. ^t BuOK	abs. THF	rt.	44%, 45 perc
3.	4,0 ekv.	0,25 ekv. ^t BuOK	abs. THF	0 °C	45%, 90 perc
4.	4,0 ekv.	0,25 ekv. ^t BuOK	abs. DMF	rt.	sok melléktermék
5.	4,0 ekv.	1,0 ekv. NaH	abs. THF	rt.	nincs izolálható termék
6.	4,0 ekv.	0,5 ekv. ^t BuOK	abs. THF	rt.	sok 15
7.	4,0 ekv.	0,2 ekv. ^t BuOK	abs. THF	rt.	49%, 45 perc
8.	4,0 ekv.	0,05 ekv. ^tBuOK	abs. THF	rt.	63%, 90 perc
9.	4,0 ekv.	0,02 ekv. ^t BuOK	abs. THF	rt.	15%, megállt a reakció

1. táblázat. Az 1. ábra reakciójának körülményei és eredményei.

A vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy a legjobb kitermelést THF oldószerben és 0,2 ekvivalensnyi ^tBuOK katalizátor segítségével tudtuk elérni. Mindezek mellett a divinil-szulfon nagy feleslegben való alkalmazása volt szükséges, melynek az oszlopkromatográfiás tisztás során a számítottnál sokkal kisebb hányadát lehetett csak visszanyerni. Ezt, illetve a közepes kitermelést a vinil-szulfon oligomerizációjának / polimerizációjának számlájára írhatjuk.⁷⁶ Valóban megfigyeltük nagyobb mennyiségű csapadék, illetve szilikáról nem eluálható anyag keletkezését.

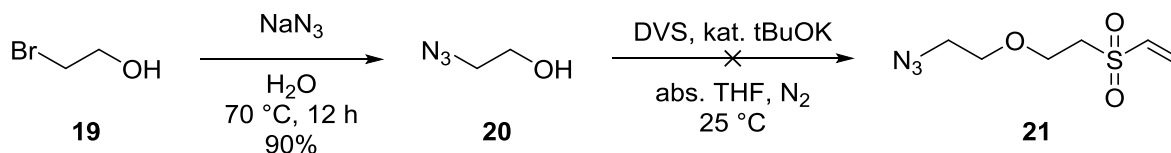
A megnövelt hidrofíliával rendelkező, etoxi csoporttal hosszabbított **2** céltermék szintéziséhez propargil-bromid (**16**) és etilén-glikol (**17**) reakciójában nyert 2-propiniloxi-etanol (**18**) addíciónáltattunk divinil-szulfonra (17. ábra). Az alkohol szintézisét oldószermentes körülmények között NaOH bázissal és a diszubsztituált termék keletkezésnek elkerülése érdekében glikol felesleggel végeztük. Az utána következő addíciós lépésről fontos megjegyezni, hogy a korábbi tapasztalattal ellentétben nem kevés mennyiségű báziskatalizátor és nagy mennyiségű divinil-szulfon felhasználásával, hanem az irodalmi arányokat követő

1,5 ekvivalens DVS és 0,2 ekvivalens ^tBuOK esetben érték el a legjobb kitermelést (48% és 58%).



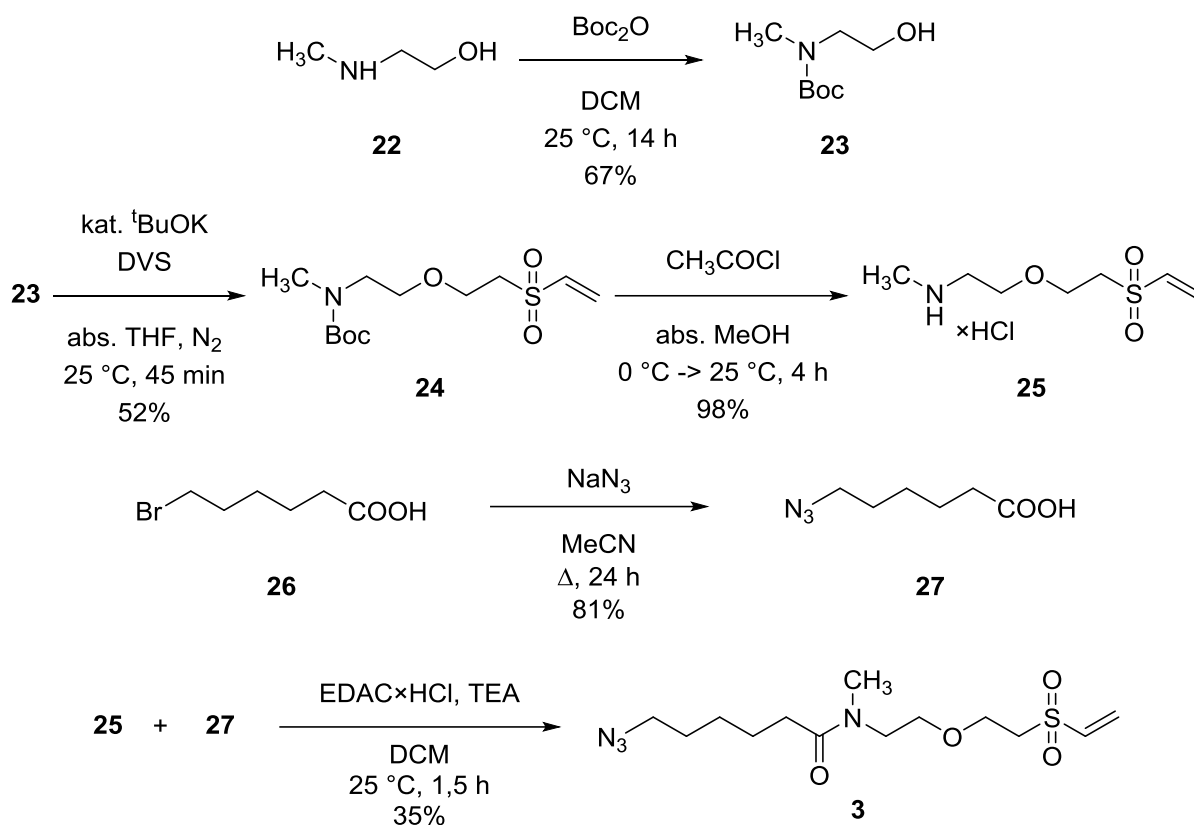
17. ábra. A **2** kémiai hírvivő előállítása.

Az azid funkciós csoporttal rendelkező kémiai hírvivő esetében a **1** szintézisének kidolgozott reakciókörülmények szerint jártunk el. A 2-brom-etanolból (**19**) előállított 2-azido-etanollal (**20**) végrehajtott addíciós lépés során azonban a várt terméket (**21**) nem sikerült izolálni, a reakcióelegyben csupán kevés etilén-oxidot és számos ismeretlen vegyületet tudtunk kimutatni (18. ábra).



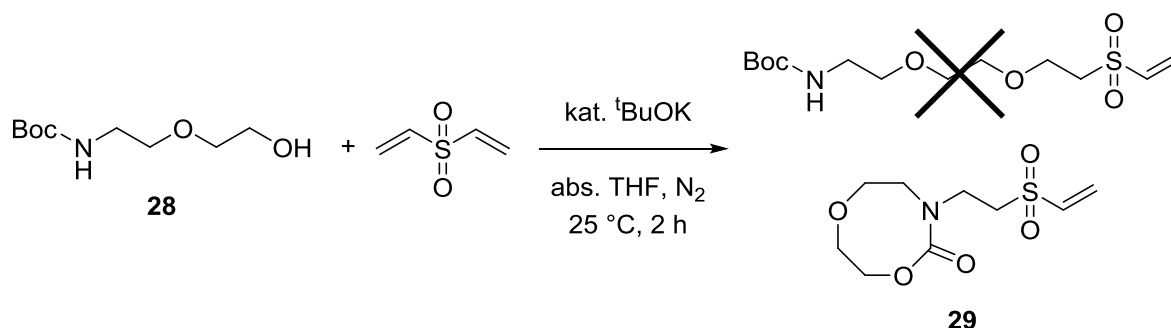
18. ábra. Első próbálkozás azid – vinil-szulfon bifunkcionális hírvivő előállítására.

Alternatív megközelítésként az azid csoport bevitelét úgy kíséreltük meg, hogy elsőként egy amin funkciós csoportot tartalmazó köztterméket állítottunk elő. Ehhez *N*-metil-aminoetanolt (**22**) Boc védőcsoporttal láttunk el. Az így kapott **23** alkohol DVS-ra való addíciója a várt 50% körüli kitermeléssel játszódtott le. Az így nyert **24** vegyületről a védőcsoport eltávolítását a hagyományos TFA/DCM eleggyel végeztem el. Bár e lépés jó termeléssel szolgáltatta a kívánt amint, a termék sokféle, kis mennyiségben jelen lévő szennyezést is tartalmazott és további tisztítást igényelt volna. Amennyiben a védőcsoport hasítását a metanolos-HCl oldattal (*in situ* előállított) végeztük, kvantitatív mennyiségben és tisztán jutottunk a szabad aminszármazék hidrogén-klorid sójához (**25**). Ebből, és 6-bromhexánsav (**26**) átalakításával nyert 6-azido-hexánsavból (**27**) EDAC×HCl kapcsolószer és trietilamin bázis segítségével nyertük a **3** azid – vinil-szulfon bifunkcionális hírvivőt (19. ábra).



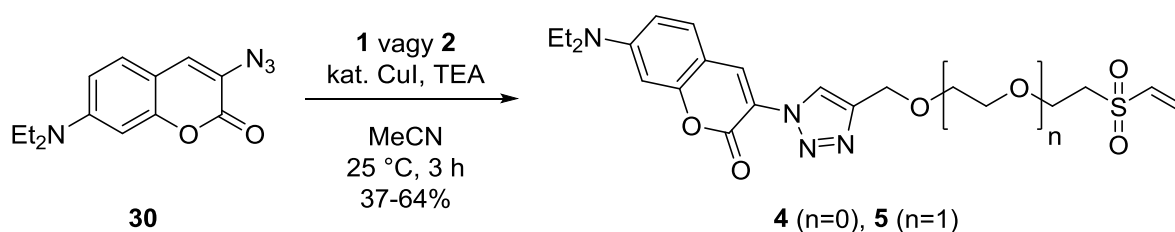
19. ábra. A **3** kémiai hírvivő előállítása.

Érdemes megjegyezni, hogy abban az esetben, amikor a fenti eljárást 2-(2-aminoetoxi)-etanolból kiindulva végeztük el, az addíciós lépés során nem a várt termékhez jutottunk. Az NMR és MS adatok alapján, illetve a Boc védőcsoport hiányára és acetyl-kloriddal való sikertelen acilezési reakcióra alapozva a **29** gyűrűs vegyület keletkezését valószínűsítjük. Ebből arra a következtetésre jutva, hogy az alkalmazott bázis alkalmas akár a védett nitrogénen található NH proton leszakítására is, az illet nem tartalmazó *N*-metil-aminoetanolt választottuk.



20. ábra. A várt termék helyett a valószínűsített **29** vegyület keletkezése.

A kémiai hírvivőkön kívül célunk volt olyan, vinil-szulfonnal ellátott fluoreszcens jelzővegyület előállítása is, mellyel a későbbiekben a szekvenciális eljárással való összehasonlításul egy lépésben jelölhető cisztein-tartalmú peptid. Választásunk a csoportban már korábban használt 3-azido-7-diethylaminokumarinra (**30**) esett, melyet az irodalomban leírt módon,⁷⁷ bár valamivel jobb kitermeléssel kaptunk meg. Ez a vegyület az általunk előállított **1** és **2** alkin funkcionizált származékokkal réz-katalizált azid-alkin cikloaddíciós reakcióban közepes hozammal szolgáltatja a **4** és **5** fluoreszcens termékeket (20. ábra).



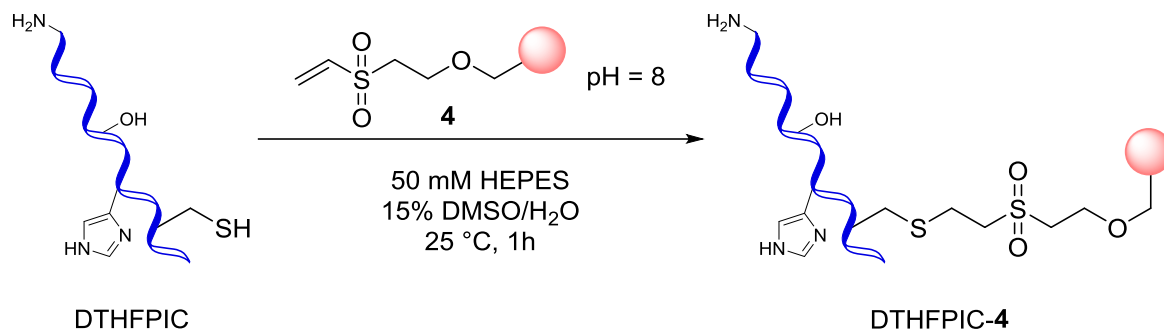
21. ábra. A **4** és **5** fluoreszcens, cisztein-specifikus jelzővegyületek előállítása.

5.1.2. Reaktivitás és szelektivitás vizsgálatok

Az előállított vegyületek felhasználásával a vinil-szulfon csoport tiolokkal szemben mutatott szelektivitás- és pH-függő reaktivitás vizsgálatát főként Baranyai Zsuzsanna doktorandusz végezte az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban. Az alábbi eredményekhez vezető út és a részletes kísérleti körülmények az ő doktori értekezésében kerülnek kifejtésre, illetve megtalálhatók a jelen értekezés alapjául szolgáló, mellékelt publikációban (Cserép *et al.* Tetrahedron, 2014).

A jelölési reakció cisztein-szelektivitásának vizsgálata érdekében a DTHFPIC szekvenciájú, nem dimerizálódó modell-oligopeptid⁷⁸ és a **4** fluoreszcens jelzővegyület reakcióját vizsgáltuk. A peptid a célzott tiol funkción kívül három, Michael-addícióban potenciális reakciópartnert tartalmazott, úgymint alifás amin- (*N*-terminális), hidroxil- (szerin oldallánc) és imidazol (hisztidin oldallánc) csoportokat. A reakció (pH = 8 HEPES puffer, 25 °C, feleslegben vett jelzővegyület) HPLC-vel való követése alapján 15 perc után még volt kiindulási peptid, 1 óra elteltével azonban az teljesen elfogyott, miközben egy új kromatográfiás csúcs jelentkezett. Az ehhez tartozó anyag izolálása után a tömegspektrometriás eredmények megmutatták, hogy a termék peptid csupán egyetlen jelölőmolekulát tartalmazott, a fragmentációs MS/MS

vizsgálatok pedig bizonyították, hogy kizárólag a cisztein oldalláncon történt reakció, azaz csak a várt DTHFPIC-4 konjugátum képződött.



22. ábra. A DTHFPIC modellpeptid cisztein-specifikus jelölése

A jelölési reakció más nukleofilek jelenlétében való pH-függőségének vizsgálatához az előző peptidet N-terminálisán egy Lys-Gly egységgel meghosszabbítottuk, hogy az így kapott KGDTHFPIC modell tartalmazzon lizin oldalláncán található $\epsilon\text{-NH}_2$ csoportot is. A kísérletek során a változó paraméterek a pH és az **1** jelzővegyület aránya volt és a kiindulási peptid teljes átalakulásáig vittük a reakciókat (2. táblázat). A termék minden esetben egyetlen vegyület volt (eltekintve a minimális diszulfid képződéstől, illetve a képződő tioéter kötés szulfoxiddá való oxidálódásától), mely az MS és MS/MS vizsgálata most is a cisztein oldalláncán egyszerűen jelölt peptidnek adódott.

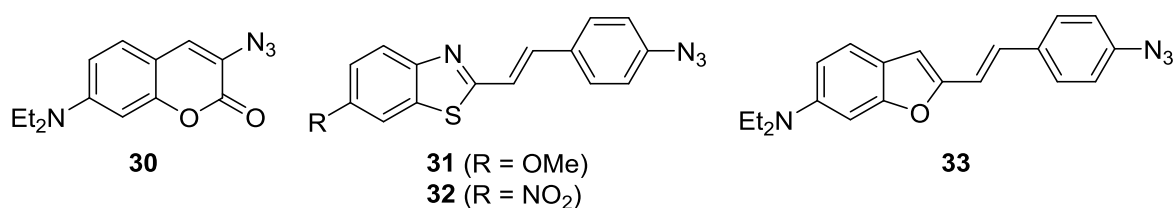
	1	pH (HEPES puffer)	Teljes konverzióhoz szükséges idő
1.	1,5 ekv.	8.0	1 perc
2.	1,5 ekv.	7.4	90 perc
3.	1,0 ekv.	7.4	120 perc

2. táblázat. A KGDTHFPIC + **1** reakció teljes lejátszódásához szükséges idő.

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a reakció a vizsgált, fiziológiásan releváns körülmény között szelektív és feleslegben vett jelölő alkalmazásakor gyorsan lejátszódik.

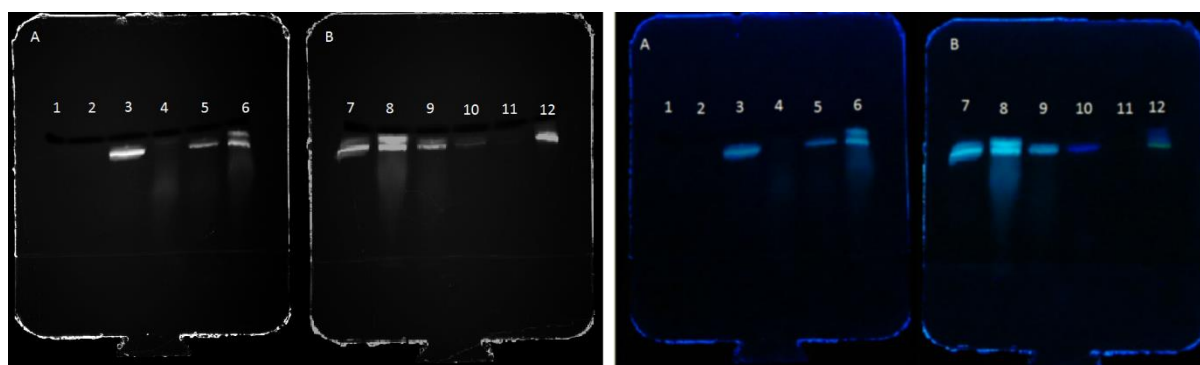
5.1.3. Szekvenciális jelölés

Az ciszteinre specifikus kémiai hírvivők szekvenciális jelölésben való alkalmazhatóságát, illetve a vinil-szulfon funkcióval ellátott fluoreszcens jelzővegyülettel való egy lépéses módosítással szembeni előnyeit gélkromatográfia segítségével a KGDTHFPIC peptiden vizsgáltuk. Ehhez először előállítottuk és izoláltuk a KGDTHFPIC-2 és KGDTHFPIC-5 konjugátumokat. Az előbbit így alkin funkciós csoporttal módosítottuk, míg utóbbi már tartalmazta a fluoreszcens csoportot. A következő lépésben a KGDTHFPIC-2 funkcionizált peptidet feleslegben vett (2 ekv.) azid funkciós csoportot tartalmazó, fluorogén jelzővegyületekkel réz-katalizált azid-alkin ciklóaddíciós reakcióban jelöltük. Az SDS-PAGE gélkromatográfiás lapokra az izolált termékekből, illetve közvetlenül a reakcióelegyeiből vittünk fel mintákat. Kontroll kísérletként egy esetben kihagytuk a réz katalizátort a reakcióból. A szekvenciális jelöléshez a 3-azido-7-dietilaminokumarint (**28**) és a kutatócsoportunkban kifejlesztett,^{79,80} fenil-azidra épülő **29**, **30** és **31** fluorogén jelzővegyületeket használtuk fel (23. ábra).



23. ábra. A szekvenciális jelölésben felhasznált fluorogén jelzővegyületek.

A gélelektroforetikus elválasztás után a géleket 365 nm-es UV fénnel világítottuk meg és a fluoreszcens foltokról fényképeket készítettünk (24. ábra.)



A	Felvitt anyag/reakcióelegy	B	Felvitt anyag/reakcióelegy
1	KGDTHFPIC	7	KGDTHFPIC-5
2	KGDTHFPIC-2	8	KGDTHFPIC + 5
3	KGDTHFPIC-5	9	KGDTHFPIC-2 + 30 + Cu(I)
4	KGDTHFPIC-2 + 30	10	KGDTHFPIC-2 + 31 + Cu(I)
5	KGDTHFPIC-2 + 30 + Cu(I)	11	KGDTHFPIC-2 + 32 + Cu(I)
6	KGDTHFPIC + 5	12	KGDTHFPIC-2 + 33 + Cu(I)

24. ábra. A gerjesztett gélek fluoreszcens képe és az egyes sávokhoz tartozó minták

Az ábrán látható, hogy a 3. sávban a vártaknak megfelelően az előzetesen előállított KGDTHFPIC-5 valóban 1 fluoreszcens foltot tartalmaz, aminek színe megegyezik az 5. sávban található KGDTHFPIC-2 + 30 reakcióban réz katalizátor jelenlétében kapott azonos termékével. Fontos megjegyezni, hogy a fluorogén tulajdonságnak köszönhetően az 5. sáv (ill. a 9-es) csak ezt az egy fluoreszcens foltot tartalmazza. A KGDTHFPIC + 5 (6. és 8. sáv) reakcióelegyben ezzel szemben az elreagálatlan jelzővegyület ugyancsak fluoreszcens sávot ad. Ez utóbbi jel egyéb alkalmazásokban (pl. fluoreszcens mikroszkópia), mint háttérfluoreszcencia jelenne meg. A 31 jelzővegyület esetében (10. sáv) ugyancsak egyetlen, a termékhez rendelhető fluoreszcens folt mutatkozik. A 32 –as jelölőnél (11. sáv) annak 365 nm-en való rossz gerjeszthetőség miatt csak igen gyenge intenzitású fluoreszcencia látható, míg a 33 esetében a reakció utáni zöld emisszió jól elkülönül a kiindulási jelzővegyület kék színétől. A katalizátor nélküli KGDTHFPIC-2 + 30 reakcióelegyben (4. sáv) nem képződött fluoreszcens termék. Mindezek az eredmények jól mutatják a szekvenciális jelölési módszer előnyét a direkt fluoreszcens jelöléssel szemben.

Összefoglalva eddigi eredményeinket elmondható, hogy az előállított vinil-szulfon csoportot tartalmazó kémiai hírvivők és fluoreszcens jelzővegyületek segítségével vizsgáltuk azok cisztein aminosavra való szelektivitását és a reakciók időbeli lefutását különböző körülmények között. A tapasztalatok alapján elmondhatjuk, hogy a jó vízoldhatósággal rendelkező vinil-szulfon reagensek fiziológias körülmények között specifikus affinitást mutattak a tiolcsoporttal szemben, ezzel a modellpeptidek gyors, szelektív és hatékony jelölését téve lehetővé. E kísérletek során a bifunkciós kémiai hírvivők a peptidekkel való reakciót követően a terveknek megfelelően alkalmasnak bizonyultak azid-alkin cikloaddíciós reakcióval történő jelölésre, így például azid funkciós csoporttal rendelkező fluorogén jelzővegyületekkel való módosításra. Ilyen jelzővegyületek felhasználásával sikerrel valósítottuk meg ciszteint tartalmazó peptid szekvenciális fluorogén jelölését, mellyel az egy lépéses módszerhez képest nagy mértékben csökkenthető az elreagálatlan jelzővegyület okozta háttérfluoreszcencia. A jelenlegi kutatások során a kifejlesztett jelzővegyületeket együttműködések keretében fehérjék szelektív jelölésére és diszulfid-hidak felhasadásának vizsgálatára kívánjuk felhasználni.

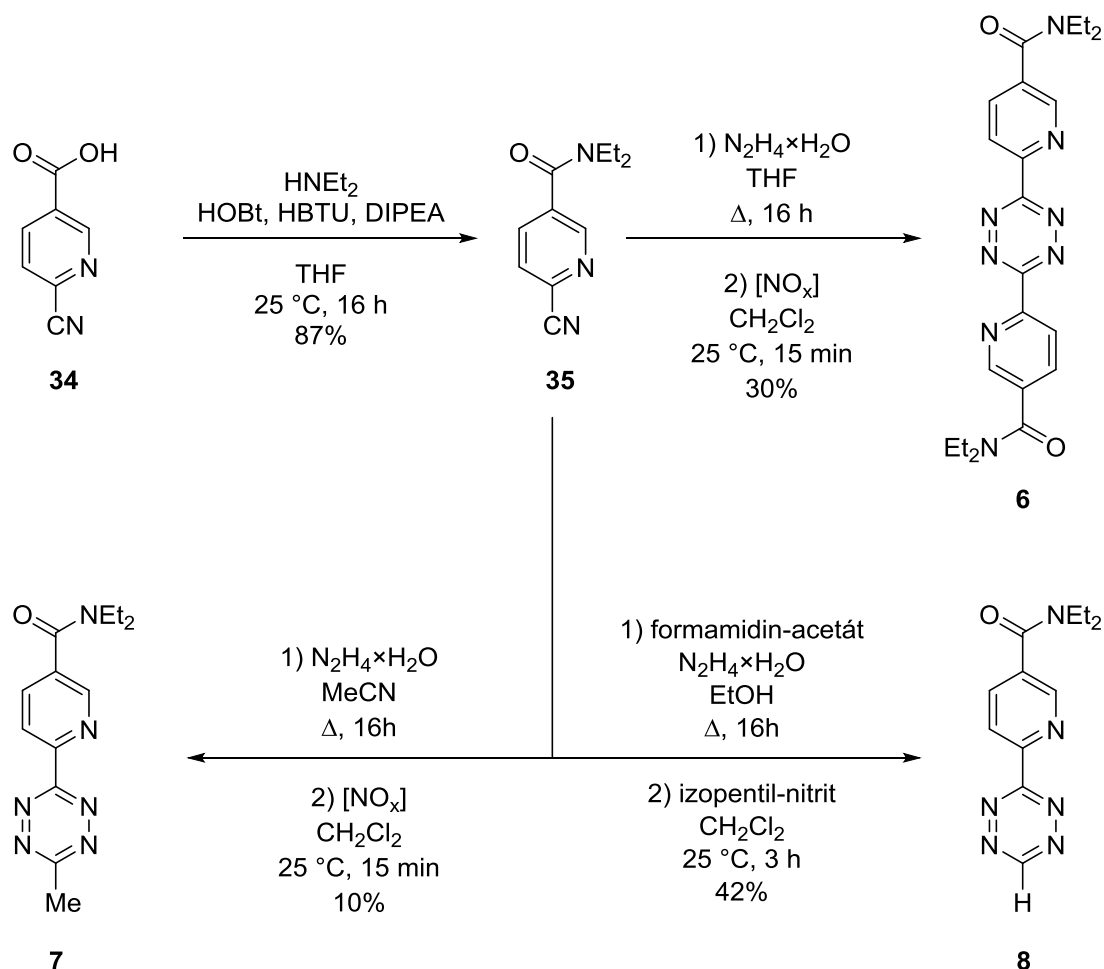
5.2. Reaktív tetrazinszármazékok

5.2.1. Szintézisek

A tetrazinok fordított elektronigényű Diels-Alder reakcióban való reaktivitása viszonylag jó valószínűséggel becsülhető a határpálya elmélet segítségével, a diének LUMO energiaszintjei alapján.^{62,66} Ennek alapján leegyszerűsítve elmondható, hogy a tetrazinok elektronhiányossága arányos azok reakciókészségével. Az irodalmi példák^{62,66} és csoportunk korábbi tapasztalatai alapján a tetrazingyűrűhöz közvetlenül kapcsolódó piridin egység különösen jó hatással van a reaktivásra, így mi is ezen alapuló vázakat terveztünk. A reakciókészség növelését, valamint a könnyű funkcionizálhatóságot nikotinsav modul beépítésével kívántuk elérni, a tetrazingyűrű felépítését pedig nitrilcsoportból kiindulva terveztük megvalósítani. Ezek figyelembevételével és az elektronikus effektusok optimális kihasználása érdekében kiindulási anyagként a 6-cianonikotinsavat (**34**) választottuk. A reaktivitás- és stabilitásvizsgálatokhoz először nikotinamid-alapú modellvegyületek előállítását terveztük. Ehhez a 6-ciano-nikotinsavat (**34**) dietilaminnal reagáltattuk benzotriazol-típusú kapcsolószerek segítségével. A reakcióban jó kitermeléssel jutottunk a megfelelő cianonikotinamidhoz (**35**) (25. ábra).

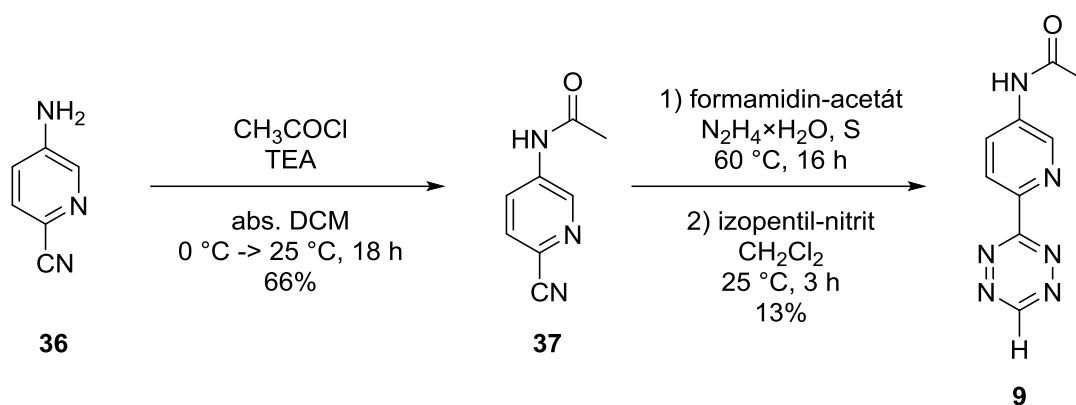
Annak ellenére, hogy az irodalomban találunk egy-két utalást tetrazinok meglepő reaktivására vagy épp inaktivitására vonatkozóan, melyet a sztérikus hatások számlájára írtak,⁸¹ pontosabb összehasonlító kutatás eddig még nem készült. A sztérikus hatások vizsgálata céljából három különböző, az előállított **35** nikotinamid származéokra épülő tetrazinszármazékot terveztünk: egy szimmetrikusan szubsztituált származékot (**6**), egy nem-szimmetrikus, egyik oldalt metilcsoportot tartalmazó változatot (**7**) és egy monoszubsztituált tetrazint (**8**). A szimmetrikus tetrazin előállításához a **35** nitrilszármazékot hidrazin-monohidráttal reagáltattuk THF oldószerben, a keletkező dihidrotetrazin származékot pedig NaNO₂ és tömény kénsav segítségével *in situ* előállított nitrózus gázokkal oxidáltuk, így jutva elfogadható termeléssel a **6** célvegyülethez. A metilcsoport beépítéshez a reakciót hasonló körülmények között, de acetonitril oldószerben végeztük, mely egyben reakciópartnerként is szolgált, így eredményezve az oxidációs lépés után a **7** nem-szimmetrikus tetrazint. A monoszubsztituált **8** célterméket nagy feleslegben vett formamidin-acetát felhasználásával és a magasabb reakcióhőmérsékletet lehetővé tevő etanol oldószerben végzett reakció segítségével állítottuk elő. Ebben az esetben, valószínűleg a tetrazin előzetesen megmutatkozó nagy reaktivitása és egyben kisebb stabilitása miatt, a nagy mennyiségben keletkező nitrózus gázok

alkalmazásakor a vegyület elbomlott, így enyhébb oxidálószerként izopentil-nitritet használva kaptuk meg a kívánt terméket közepes termeléssel.



25. ábra. A **6**, **7** és **8** modell tetrazinok előállítása 6-cianonikotinsavból.

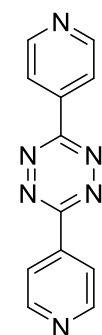
A későbbi vizsgálatok során beigazolódott a monoszubsztituált **8** tetrazin kimagasló reaktivitása és viszonylag alacsony stabilitása. A reaktivitás megtartása mellett kísérletet tettünk a stabilitás növelésére az amid csoport kapcsolódási sorrendjének megváltoztatásával (**9**) (26. ábra). A szintézis során 5-aminopikolinonitrilből (**36**) indultunk ki, melyből acetyl-kloriddal való acilezési reakció során jutottunk a **37** vegyülethez, amit a **8** szintézise során használt körülmények alkalmazásával próbáltunk monoszubsztituált tetrazinná alakítani.



26. ábra. A **9** tetrazin előállítása.

A reakció során azonban csak a szimmetrikus változat keletkezett izolálható mennyiségben. A célterméket csak kén segédreagens segítségével tudtuk elfogadható termeléssel előállítani (26. ábra).

A tetrazinok vizsgálata az irodalomban általában eltérő körülmények között történik, emiatt az egymáshoz való viszonyítás nehézkes, azt csak egy közös modellel való összehasonlítás teszi lehetővé. Ez a modellvegyület legtöbbször a dipiridil-tetrazin (DPT, **38**, 27. ábra), így mi is ezt választottuk összehasonlítási alapként. A DPT-t az irodalomban⁸² leírt módon állítottuk elő.



38 (DPT)

27. ábra. A **38** referencia tetrazin (DPT).

5.2.2. Reaktivitás és stabilitás vizsgálatok

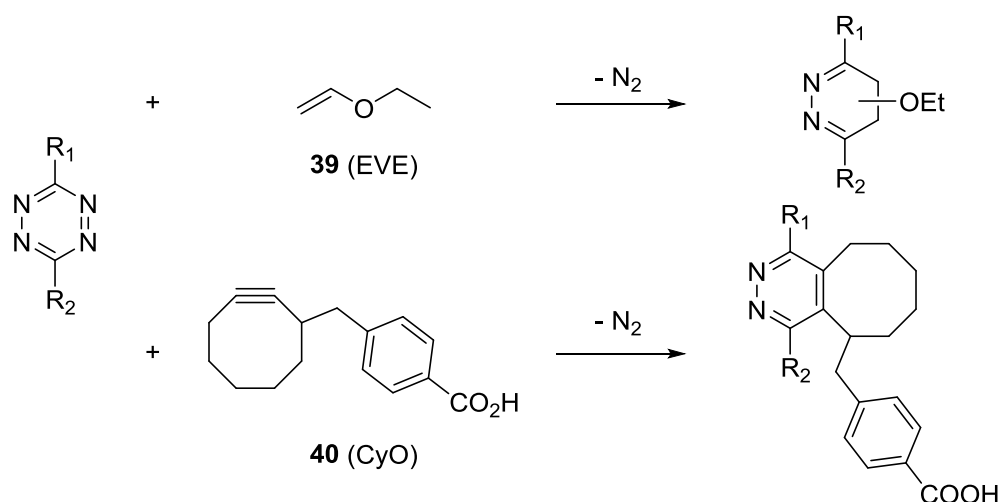
A tetrazinok várható reaktivitásának becslésére azok LUMO energiái alapján tettünk kísérletet, melyeket a Gaussian 09 csomaggal⁸³ Hartree–Fock számításokkal 6-311++G** bázison, B3LYP funkcionállal optimalizált geometriák alapján határoztunk meg (3. táblázat). Az elméleti kémiai számításokat Dr. Kállay Mihály (BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék) végezte.

Tetrazin	DPT	6	7	8	9
LUMO (eV)	0,28	0,46	0,83	0,71	0,69

3. táblázat. A tetrazinok számított LUMO energiái.

A számítások alapján legreaktívabb diénnek a referencia dipiridil-tetrazint várnánk. Ezt követné sorban a szimmetrikusan szubsztituált **6**, a monoszubsztituált **8**, végül a metilsoporttal rendelkező **7** származék. Az amiddal szubsztituált tetrazin (**9**) esetében a becslés a hozzá szerkezetileg hasonló **8**-as tetrazinhoz hasonló reaktivitást jelez.

Az előállított tetrazinok reaktivitásának meghatározásakor fontos tényező a dienofil reakciópartner reakciókészsége is. A jellemző sebességi állandók meghatározásakor elsőként a jól hozzáférhető kettős kötéssel rendelkező, ám alacsony reaktivitású etil-vinil-étert (EVE, **39**) és egy reaktívabb, de nagyobb térigényű ciklooktint (CyO, **40**) használtunk (28. ábra).



28. ábra. Tetrazin Diels-Alder reakciója etil-vinil-éterrel (**39**) és egyszerű ciklooktinnal (**40**).

Reakció etil-vinil-éterrel

A tetrazinok fordított elektronigényű Diels-Alder reakciói másodrendű kinetika szerint zajlanak le. Mivel a reakció során az eredetileg piros-lila tetrazinok színtelen / sárga vegyületekké alakulnak, a reakció jól követhető spektrofotometriásan. Oldhatósági okok miatt a vizsgálatokat 25 °C-on, DMSO/H₂O (9/1 V/V) oldószerben végeztük a reakcióelegy folyamatos kevertetése közben. A mérések során az abszorbancia változását néztük az idő függvényében az egyes tetrazinokra jellemző abszorpciós hullámhossz maximumokon (510-550 nm).

Az EVE alacsony reaktivitása miatt és a vizsgálatok leegyszerűsítése érdekében a vele való vizsgálatok során pszeudo-elsőrendű körülményeket alkalmaztunk. Ehhez a dienofil reagens tetrazinhoz képest sokszoros (50 – 100-szoros) koncentrációjú oldatait használtuk, ami így a reakció teljes időtartama alatt állandónak tekinthető. Ennek köszönhetően a másodrendű $v = k_2 \times c_{\text{tetrazin}} \times c_{\text{reagens}}$ egyenlet helyett a $v = k' \times c_{\text{reagens}}$ összefüggéssel számolhatunk, ahol a látszólagos sebességi állandó $k' = k_2 \times c_{\text{tetrazin}}$. Ekkor a kiindulási abszorbancia érték ismeretében az $\ln(A_0/A)$ értéket ábrázolva az idő függvényében, majd a mérési pontokra egyenest illesztve annak meredeksége adja meg a k' -t és így $k_2 = k' / c_{\text{tetrazin}}$ összefüggéssel kapható. A mérési eredményeket a 4. táblázat foglalja össze.

Tetrazin	DPT	6	7	8	9
LUMO (eV)	0,28	0,46	0,83	0,71	0,69
k_2 (EVE) / $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	0,0012	0,008	0,00145	0,024	0,010

4. táblázat. A különböző tetrazinok LUMO energiái és etil-vinil-éterrel szembeni reaktivitása.

A kapott eredmények jól mutatják, hogy a piridin gyűrűn kívül amid funkciós csoporttal is rendelkező **6** szimmetrikus tetrazin a számításokkal ellentétben, de az elektronszívó csoportokon alapuló intuíciónak megfelelően reaktívabbnak bizonyult a modellként szolgáló dipiridil-tetrazinnál. Az egyik nikotinamid-szubsztituens metil csoportra való cseréjével kapott tetrazin esetében (**7**) a reaktivitás egy nagyságrenddel csökkent, míg a monoszubsztituált tetrazin (**8**) az elektronszívó csoportok és LUMO energia alapján reaktívabbnak várt **6**-hoz képest aktívabbnak mutatkozott, ezzel rámutatva a sztérikus hatások szerepére. Az acilezett aminopiridin csoportot tartalmazó tetrazin a vártan megfelelően a **8**-hoz képest hasonló k_2 értékekkel rendelkezett.

Reakció egyszerű ciklooktinnal

A sztérikus hatás további vizsgálatához a **6** szimmetrikus, valamint a **8** és **9** tetrazinok esetében a vizsgálatot nagyobb térigényű dienofillel (CyO, **40**) is megismételtük. A dienofil nagyobb reaktivitása azonban nem tette lehetővé pszeudo-elsőrendű körülmények alkalmazását, a reakció túl gyorsan játszódott le a számításokhoz szükséges kezdeti lineáris szakasz felvételéhez. A másodrendű körülmények közt való méréshez a számítások megkönnyítése céljából a reakcióelegyben a reaktánsok azonos koncentrációját biztosítottuk,

ekkor a tetrazin aktuális koncentrációjára az $c^{-1} = k_2 \times t + c_0^{-1}$ összefüggés írható fel. A koncentráció a mért abszorbancia értékéből a tetrazin moláris abszorpciós koefficiensének ismeretében a Lambert-Beer-törvény ($A = \varepsilon \times l \times c$) alapján számolható. Így a tetrazinok ε értékének meghatározása után a koncentrációk reciprokát ábráztuk az idő függvényében és a kapott pontokra illesztett egyenes meredeksége adta meg a másodrendű sebességi együtthatót (5. táblázat).

Tetrazin	6	8	9
LUMO (eV)	0,46	0,71	0,69
k_2 (CyO) / $M^{-1}s^{-1}$	0,23	6,25	2,89

5. táblázat. A választott tetrazinok CyO ciklooktinnal szembeni reaktivitása.

Az adatokból kitűnik, hogy a monoszubsztituált **8** és **9** tetrazinok az energetikailag kedvezőbb szimmetrikus **6** –os származékhoz képest egy nagyságrenddel gyorsabban reagáltak. Ezek az eredmények rávilágítanak a diénen levő szubsztituensek szterikus hatásaira, melyek főleg nagyobb térigényű dienofil partner esetében okoznak nagyobb eltérést az LUMO energiák által várható sorrendtől.

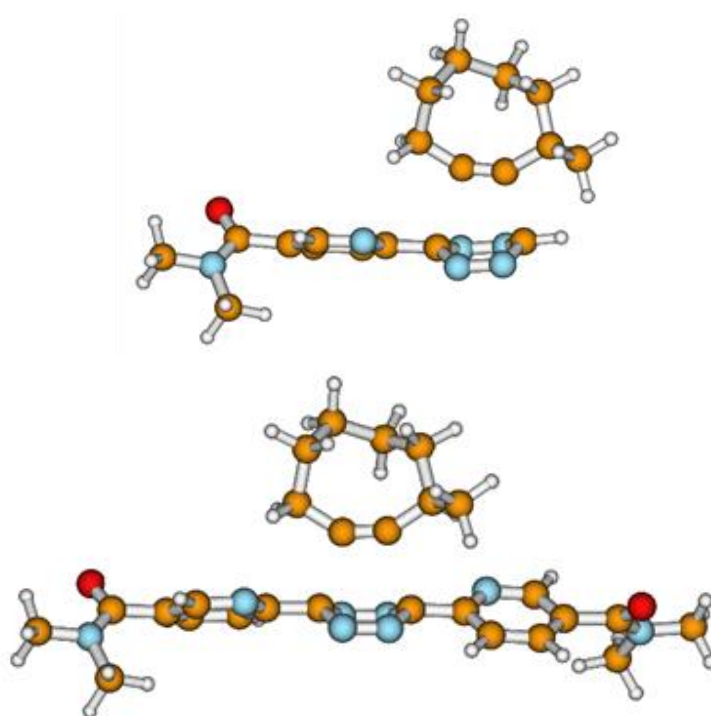
Átmeneti állapotban alapuló számolások

A mérési eredményeken alapuló reaktivitási sorrendet a szterikus effektusokat is figyelembe vevő elméleti számításokkal is igazolni akartuk. A kvantumkémiai számítások Gaussian 09 csomaggal⁸³ történtek és a számítások gyorsítása érdekében a tetrazinokon lévő etil csoportokat metillel helyettesítettük. A geometriákat sűrűségfüggvény (DFT) szintjén optimalizáltuk, B3LYP funkcionált és 6-311++G** bázist alkalmazva. Minden számított molekula esetében több stabil konformer is létezik, ezek energiája csupán kismértékben tér el egymástól. A további számítások során a geometria optimalizáció után legkisebb energiával rendelkezőt vettük figyelembe. Ezen kívül ahol az átmeneti állapotban többféle szerkezet is lehetséges volt, minden esetben meghatároztuk az aktivációs gátat és a legkisebb energiával rendelkezőt vettük alapul. Végül az optimalizált geometriáknál megállapítottuk a vibrációs frekvenciákat, és az aktivációs Gibbs-energiákat (6. táblázat) merev harmonikus oszcillátor megközelítéssel számítottuk ki.

Tetrazin	6	8
ΔG^\ddagger (EVE) / kcal/mol	33,4	31,5
ΔG^\ddagger (CyO) / kcal/mol	29,4	24,4

6. táblázat. A Gibbs aktivációs energiák a **6** és **8** tetrazinok, illetve EVE és CyO között.

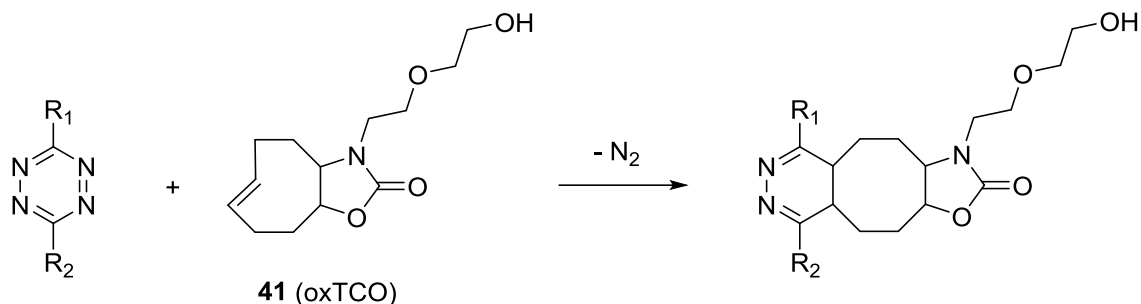
Az így kapott számok jó egyezést mutatattak a kísérleti adatokkal, a szimmetrikus **6** tetrazinnál a reakció mindkét dienofillel nagyobb aktiválási energiát igényelt, mint a monoszubsztituált **8** származék esetében. Ezen kívül a **6** és **8** közti aktiválási energia különbség nagyobbak adódott a CyO esetében (5,0 kcal/mol), mint az EVE-val (1,9 kcal/mol), ami jól tükrözi a gyakorlatban tapasztalt sebességi állandókban megfigyelhető különbséget (közel 30-szoros CyO-val, 3-szoros EVE esetében). A sztérikus gátlás hatása jól látható az átmeneti állapotokban is (29. ábra), ahol a CyO metil csoportja közel kerül a piridin gyűrű hidrogénjéhez, ezzel jelentős taszítást létrehozva.



29. ábra. Szerkezetek az átmeneti állapotban a **8** + CyO (fent) és **6** + CyO (lent) reakcióban.

Reakció reaktív *transz*-ciklookténnel

A nikotinamidra épülő tetrazinok reaktivitásnak összehasonlításának utolsó lépéseként vizsgáltuk reakciójukat a csoportunkban fejlesztett, fordított elektronigényű Diels-Alder reakcióban igen reaktív oxTCO⁸⁴ (**41**) *transz*-ciklooktén származékkal szemben is (30. ábra).



30. ábra. Tetrazin Diels-Alder reakciója OxTCO-val (**41**).

Az első eredmények azonban gyorsan rámutattak arra, hogy a tetrazinok oxTCO-val szemben túl reaktívak a hagyományos, kézi összekeveréssel járó módszerrel való méréshez. A problémát stop-flow technika alkalmazásával tudtuk kiküszöbölni, ezzel újra pszeudo-elsőrendű körülményeket tudtunk biztosítani és a méréseket közel fiziológiás körülmények között (1% DMSO pH = 7,2 PBS pufferben és 36 °C) végeztük. Az így kapott abszorbancia értékek idő függvényében való ábrázolása után pedig közvetlenül exponenciális függvény illesztésével kaphattuk meg a k' értékeket. A méréseket több dienofil (de minden esetben pszeudo-elsőrendű körülményeket biztosító) koncentrációval is elvégezve, majd az így kapott k' értékeket ábrázolva a koncentráció függvényében, majd a mérési pontokra egyenest illesztve annak meredeksége adta meg a k_2 értékeket (7. táblázat).

Tetrazin	DPT	6	7	8
k_2 (OxTCO) / $M^{-1}s^{-1}$	2100	7900	1000	17000

7. táblázat. A tetrazinok oxTCO-val szembeni reaktivitása.

A mért sebességi állandók a várt sorrendet adták, a nagyon magas értékek jól reprezentálják, hogy e reakciók a gyakorlatban másodpercek (vagy **8** esetében még rövidebb idő) alatt teljesen lejártnak.

Stabilitás

A gyakorlati felhasználhatóság mérlegeléséhez szükségünk volt az egyes tetrazinszármazékok stabilitására is fiziológiához hasonló körülmények között. Ehhez 10% DMSO-ot tartalmazó, pH = 7,2-es PBS pufferben oldottuk őket, majd a rájuk jellemző abszorpciós hullámhossz maximumokon követtük az abszorbancia csökkenését az idő előrehaladtával. Az átlagos féleletidők alapján a stabilitás fordítottan arányosnak mutatkozott a reaktivitással (8. táblázat), azaz a legreaktívabb **8** tetrazin bomlott el vizes közegben a leghamarabb. A másik véglet, az egyik oldalán metil-szubsztituált **7** tetrazin ezzel szemben különösen stabilnak mutatkozott hasonló körülmények között. A szimmetrikus tetrazin a **8**-hoz hasonló stabilitással bírt, de kisebb reaktivitással rendelkezik, míg az amid csoport változtatásával nyert **9** származék kicsit alacsonyabb reaktivitás mellett valamivel stabilabbnak bizonyult, ám e különbségek nem számottevőek.

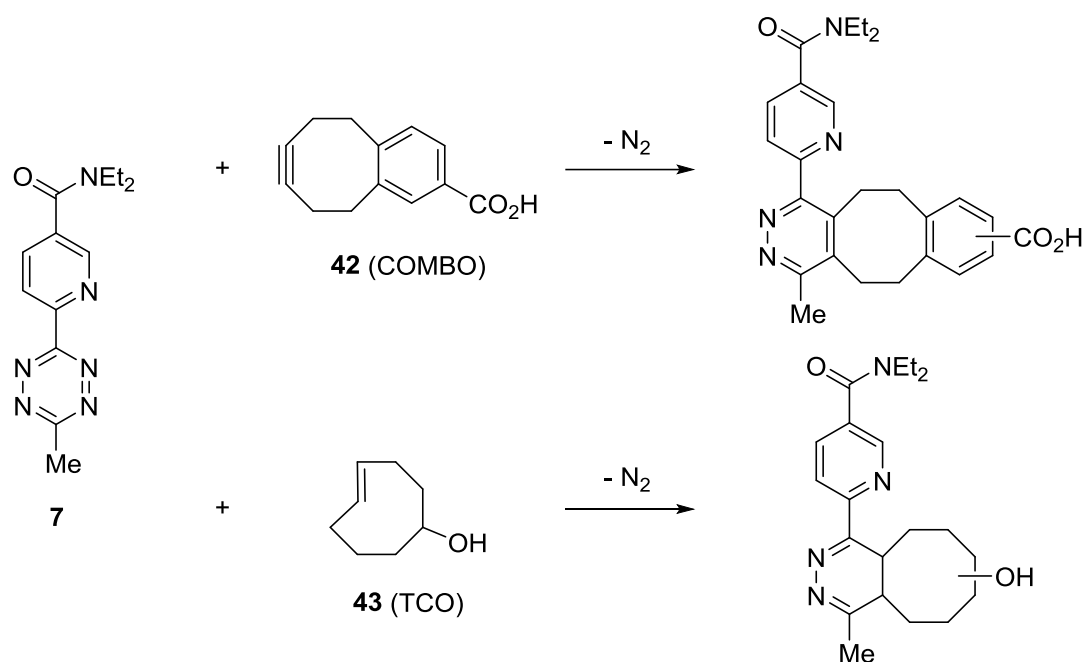
Tetrazin	DPT	6	7	8	9
$t_{1/2}$ (h)	3	4	88	4	6

8. táblázat. Az egyes tetrazinok pufferben (pH = 7,2) mért stabilitása.

Ezek alapján a **8** származék olyan esetben lehet hasznos, ahol a jelzővegyületet funkcionálizáljuk vele és a dienofillel módosított biomolekula minél gyorsabb (pár perces) jelölése a fontos. Az ellenkező esetben, mikor a tetrazinvázat kívánjuk a jelölendő biomolekula előzetes funkcionálizálására használni, a lassabb, de a dipiridil-tetrazinnal összemérhető reaktivitású viszont sokkal stabilabb **7** tetrazin lehet segítségünkre.

Reakció COMBO-val és TCO-val

A **7** tetrazin gyakorlati felhasználhatóságának vizsgálatakor meghatároztuk a reaktivitását feszült gyűrűt tartalmazó dienofilekkel szemben. Ehhez egy, a csoportunkban kifejlesztett reaktív cikloooktint, COMBO⁸⁵ (**42**) és egy általánosan használt *transz*-cikloooktént, TCO⁸⁶ (**43**) használtuk fel (31. ábra). A méréseket stop-flow technikával végeztük, az oxTCO-nál leírt módszer szerint.



31. ábra. A **7** tetrazin Diels-Alder reakciója COMBO-val (**42**) és TCO-nel (**43**).

A kapott eredmények (9. táblázat) azt mutatták, hogy a **7** tetrazin mind a COMBO-val, mind a TCO-val igen gyorsan reagált, ezzel igazolva bioortogonális ligációs eljárásokban való használhatóságát. Érdekes megjegyezni, hogy a TCO és oxTCO közötti négyszeres reaktiváskülönbség összhangban áll más tetrazinokkal való reakciókban kapott adatokkal.⁸⁴

Tetrazin	7
k_2 (COMBO) / $M^{-1}s^{-1}$	210
k_2 (TCO) / $M^{-1}s^{-1}$	4000

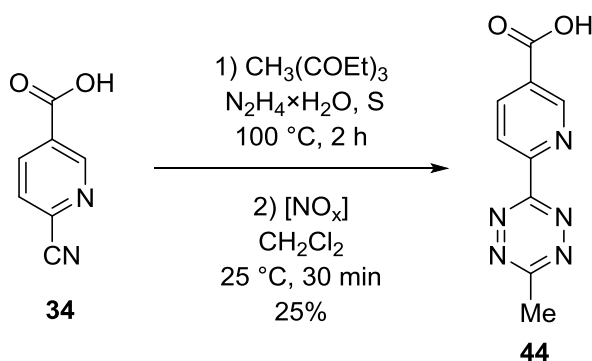
9. táblázat. A **7** tetrazin COMBO-val és TCO-nel szembeni reaktivitása.

5.2.3. Oligonukleotid jelölés

A kellőképpen reaktívnak és stabilnak bizonyult **7** tetrazinnal célunk olyan 2'-deoxiuridin építőelem (kémiai hírvivő) létrehozása volt, mellyel lehetővé válik a tetrazin nukleinsavakba építése szilárdfázisú oligonukleotid szintézissel vagy polimeráz láncreakcióval (PCR). Ehhez a tetrazint az uridin nukleobázis 5-ös pozíciójába aminopropin összekötő elemén át terveztük kapcsolni, ugyanis az általánosan használt DNS polimerázok (pl. KlenTaq) a tapasztalatok

szerint jól tolerálják az ilyen típusú módosításokat, másrészt a kisméretű tetrazin ilyen pozícióban való elhelyezése várhatóan kevésbé befolyásolja majd szerkezetet.

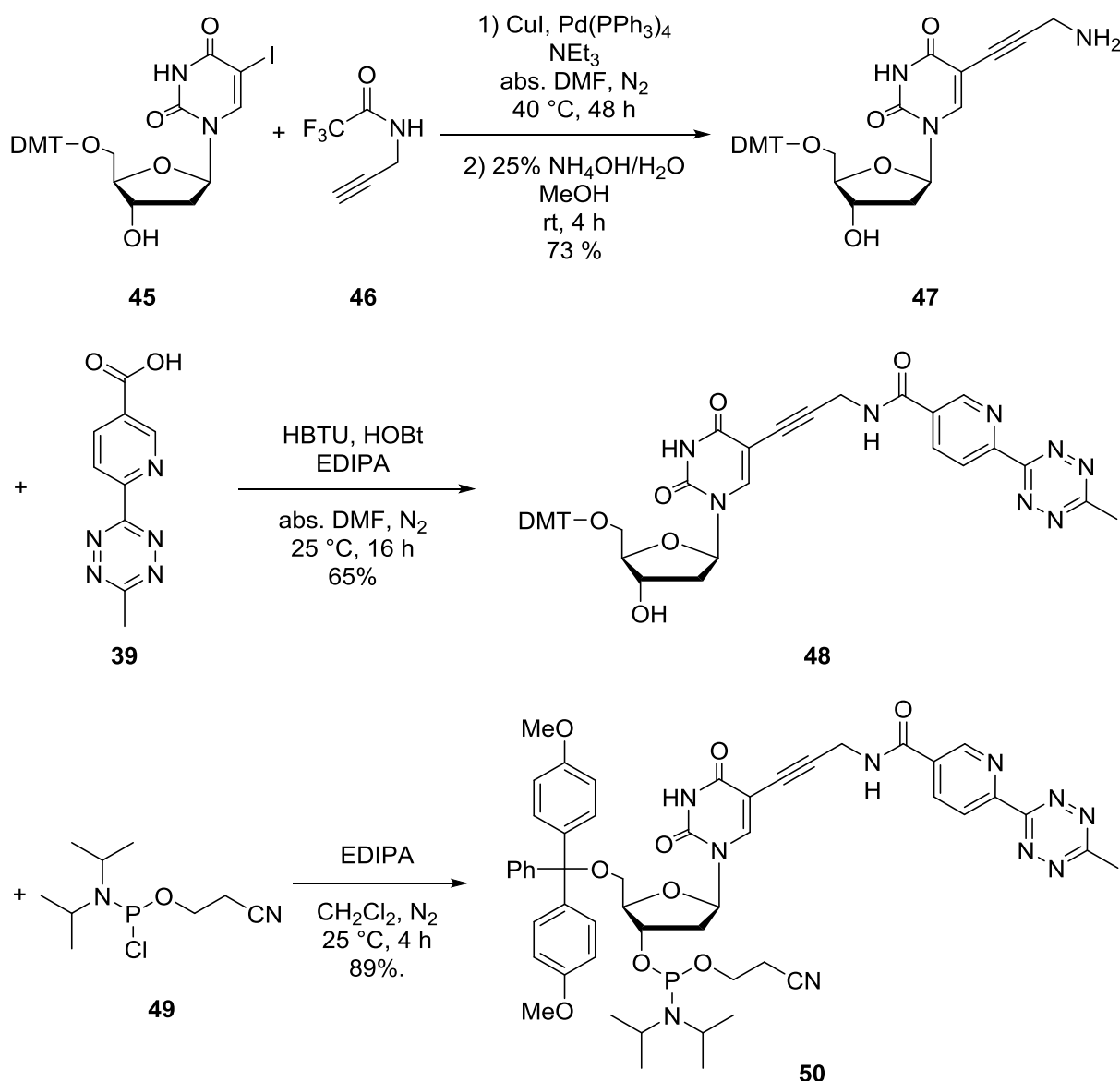
Ehhez szükség volt a szabad karboxilcsoportot tartalmazó tetrazinra is (**44**). Ennek előállításakor elsőként a **7** modellvegyülethez vezető reakciókörülményeket próbáltuk ki, azonban az akkor még elfogadhatónak ítélt kitermelést sem sikerült elérni, és szinte csak a szimmetrikus származék képződött. Ennek hátterében valószínűleg a **34**-nek a **35** amid formához képest rosszabb oldhatósága áll, így az oldószer megváltoztatása mellett döntöttünk. Ekkor azonban a metilcsoport bejuttatásáért felelős reagensen is változtatni kellett. Acetonitril helyett az aktívabb, jó távozó csoportokkal rendelkező etil-ortoacetátot használva etanol oldószerben már jobb termelést sikerült elérnünk (7-15%). Még jobb hozammal sikerült izolálni a célvegyületet amikor a reakciót oldószer nélkül (a hidrazin jól oldotta a kiindulási anyagot, bár az ortoacetáttal külön fázist alkotott, így intenzív keverésre volt szükség) és a **9** előállításakor már eredményesen alkalmazott kén használata mellett végeztük el (32. ábra). Így a terméket a nem-szimmetrikus tetrazinok esetében igen jónak számító 25%-os termeléssel sikerült előállítanunk (32. ábra).



32. ábra. Konjugálható, nem-szimmetrikus tetrazin (**44**) előállítása.

Ezzel párhuzamosan, kereskedelmi forgalomban elérhető, dimetoxi-tritil (DMT) védőcsoporttal rendelkező 5-jód-2'-deoxiuridint (**45**) az irodalomban leírt módhoz⁸⁷ hasonlóan Sonogashira kapcsolásban trifluoracetil védőcsoporttal ellátott propargilaminnal (**46**) reagáltattuk, majd a védőcsoportot vizes ammónia-oldattal távolítottuk el. Az így kapott, amin-funkcionalizált 2'-deoxiuridinhez (**47**) amidkötés kialakításával kapcsoltuk a szabad karboxil-csoporttal rendelkező **39** tetrazint. A tetrazinnal módosított **48** származékot végül 2-cianoetil-*N,N*-diizopropil-klórfoszforamidit (**49**) segítségével alakítottuk a szilárd fázisú oligonukleotid szintézisben felhasználható aktivált **50** foszforamidittá (33. ábra).

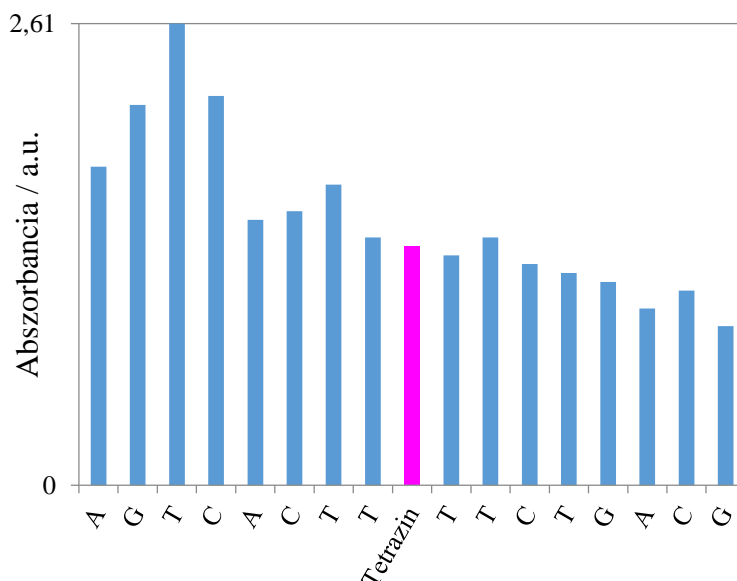
Az **50** tetrazin-funkcionált dezoxiuridin építőelem oligonukleotid láncba való beépítését Dr. Effi Bätzner végezte prof. Wagenknecht kutatócsoportjában (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Németország) standard szilárdfázisú oligonukleotid szintézis segítségével. A részletes kísérleti körülmények a jelen értekezés alapjául szolgáló, mellékelt publikációban (Cserép *et al.* Synthesis, 2015) találhatóak meg.



33. ábra. A tetrazint tartalmazó **50** dezoxiuridin építőelem szintézise.

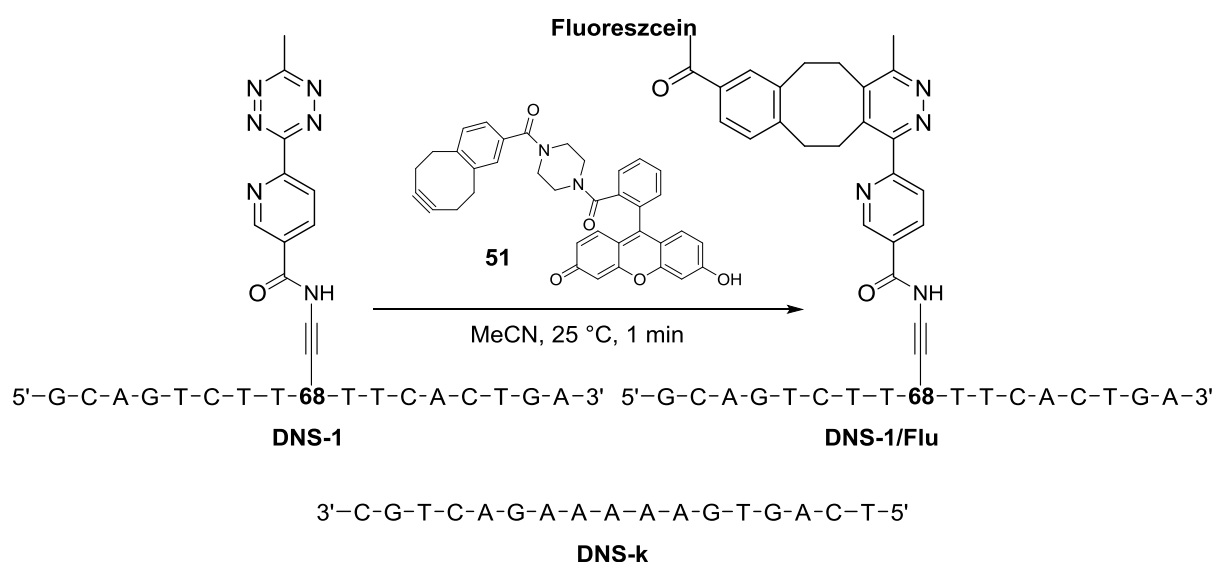
Célunk a tetrazint tartalmazó 3'-A-G-T-C-A-C-T-T-**50**-T-T-C-T-G-A-C-G-5' (**DNS-1**) oligonukleotid lánc felépítése volt, melynek során figyeltük a nukleobázisok beépülésének hatékonyságát. Ehhez az egyes kapcsolásokat követő, dimetoxi-tritil védőcsoportok eltávolításával járó lépésben mértük a keletkező tritil kationok abszorbanciáját (ún. tritil-

monitorozás). Ennek alapján a módosított építőelem hasonló eredményességgel épült be, mint az általános A, G, T és C elemek (34. ábra).



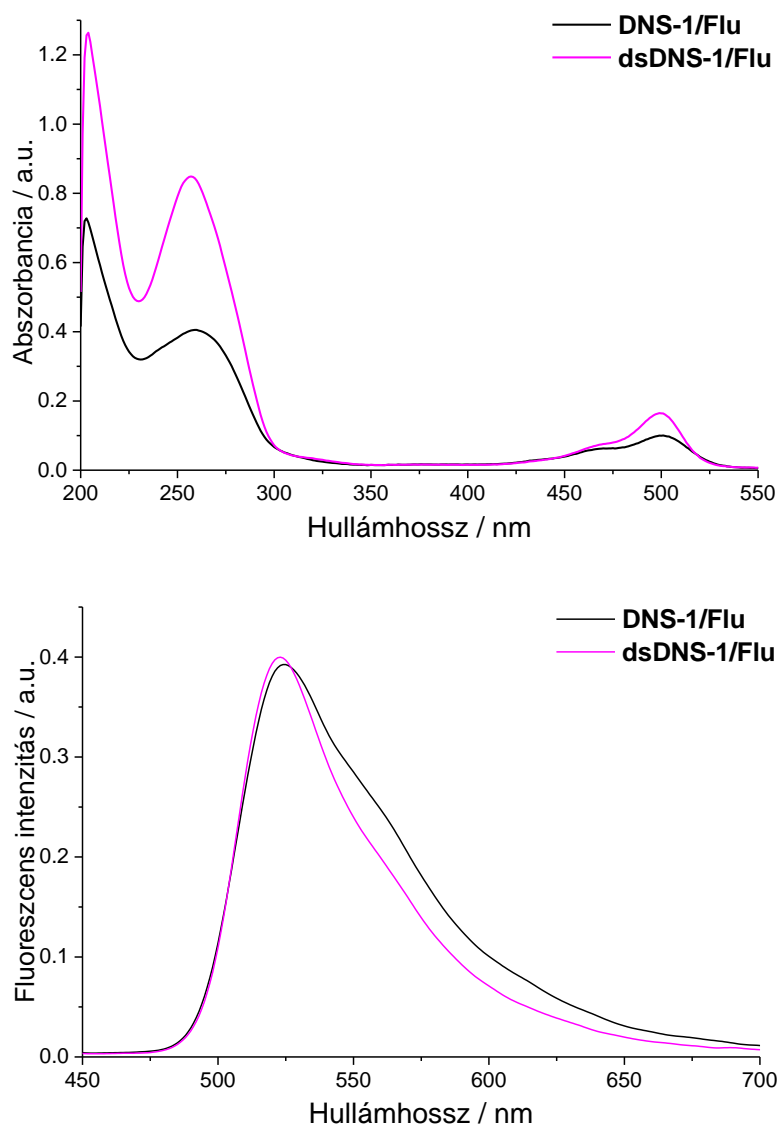
34. ábra. A **DNS-1** szintézisének tritil-monitorozása.

Az elkészült oligonukleotid láncot még a szilárd hordozón COMBO cikloooktinnal⁸⁵ ellátott fluoreszcein festékkel (**51**) reagáltattuk (35. ábra). A jelölt **DNS-1/Flu** tömegspektrometriás és spektrofotometriás vizsgálatai igazolták a tetrazint tartalmazó nukleotid sikeres beépülését és fluoreszcens jelölését ($\lambda_{\text{abs}} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$).



35. ábra. A tetrazint tartalmazó **DNS-1** lánc jelölése COMBO-fluoreszceinnel (**51**).

Érdemes megjegyezni, hogy a komplementer szállal (**DNS-k**) való hibridizáció után a kétszálú DNS-ben (**dsDNS-1/Flu**) a fluoreszcein jellemző abszorpciós koefficiense megnövekedett (vagyis megnőtt az abszorbancia 500 nm-en, 36. ábra, felül). Ez a változás a hibridizációkor fellépő szerkezeti változásokkal magyarázható, melyek során az eddig véletlenszerűen feltekeredett lánc elrejtette a festéket. Az anellációval együtt járó kitekeredés viszont kiszorította a fluoreszcein egységet a lánc külsejére, megszüntetve így az árnyékoló / védő hatást. Ez összhangban áll azzal, hogy a kétszálú DNS olvadási hőmérséklete (57,1 °C) alig alacsonyabb a módosítatlan változatnál (59,5 °C).



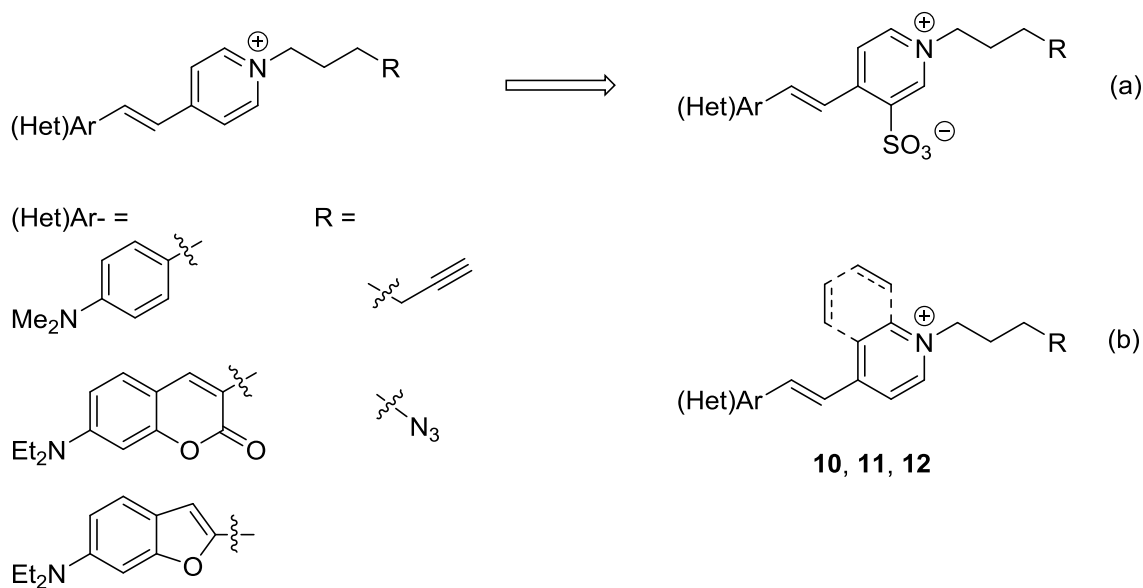
36. ábra. A fluoreszceinnel jelölt szál (**DNS-1/Flu**) abszorpciós és emissziós spektrumai, illetve a komplementer szállal való anelláció hatása (**dsDNS-1/Flu**).

Összefoglalva eredményeinket elmondható, hogy sikerrel állítottunk elő különböző, nikotinsavval szubsztituált tetrazinokat. Ezek felhasználásával vizsgáltuk az elektronikus és sztérikus tulajdonságok hatását tetrazinok és dienofilek fordított elektronigényű Diels-Alder reakciójában. A tapasztalatok megmutatták, hogy a sztérikus effektus befolyása sokkal nagyobb a vártnál és e kísérleti eredményeket elméleti kémiai számítások segítségével is alátámasztottunk. Ezzel a reaktivásra olyan új, az átmeneti állapotot és így a reakciópartnert is figyelembe vevő predikciós modell állítható fel, mely a korábban alkalmazott, csupán a LUMO energiákat figyelembe vevő módszernél pontosabban jósolja meg tetrazinok reaktivitását. A reakciósebességen kívül vizsgáltuk a tetrazinok stabilitását is. Az eredmények alapján a legreaktívabb monoszubsztituált 8 származék olyan esetben lehet hasznos, ahol pár perces jelölési idő is elegendő, ellenkező esetben a lassabb, de a dipiridil-tetrazinnal összemérhető reaktivitású viszont sokkal stabilabb 7 tetrazin lehet segítségünkre. Ezt a kedvező reaktivitás/stabilitás viszonytal rendelkező származékot bioortogonalizált nukleotid építőelem előállítására használtuk fel, melyet automatizált technológiával oligonukleotid láncba építettünk be és sikerrel jelöltünk meg fluoreszcens jelzővegyület alkalmazásával. A polimeráz láncreakcióval DNS láncba enzimatis úton való beépítést lehetővé tevő származékok előállítása karlsruhei partnerünkénél van folyamatban.

5.3. Lepidínium-alapú fluoreszcens jelzővegyületek

5.3.1. Szintézisek

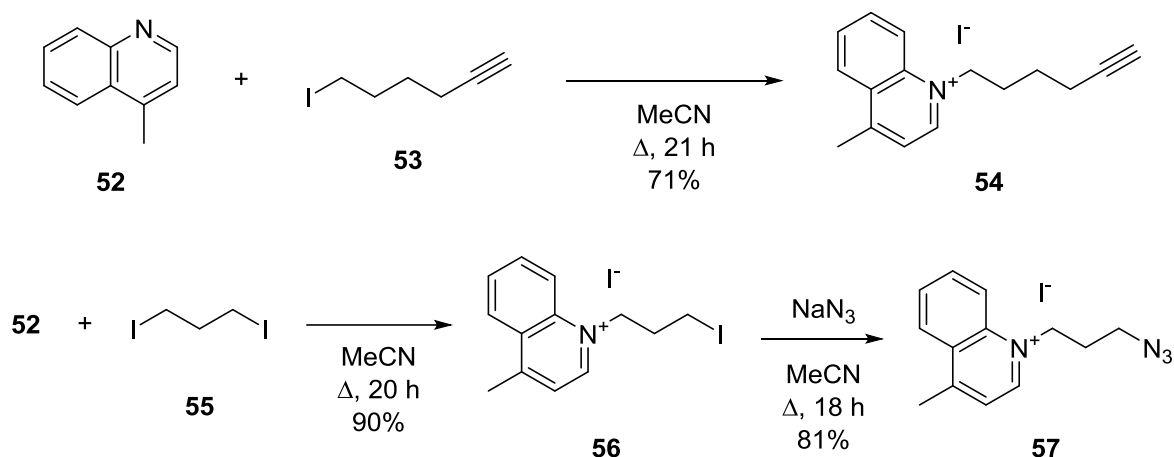
A távoli vörös – közeli IR tartományban emittáló mega-Stokes fluoreszcens jelzővegyületek tervezésekor a kutatócsoportunkban korábban előállított, sztilbén típusú pikolínium-vázás fluorofórokat vettük alapul.⁷³ Ezek mind 100 nm feletti Stokes-eltolódással és a különböző aromás csoportoktól függően a narancs – vörös tartományban való emisszióval rendelkeztek (37. ábra, bal oldal). E tulajdonságaik kiterjedt konjugált rendszert tartalmazó *push-pull* szerkezetüknek tulajdoníthatóak.⁸⁸ Célunkat, az emissziós hullámhosszak IR tartomány felé tolását így elsőként az elektronszívó karakterrel rendelkező pikolínium rész elektronszívó (*pull*) jellegének felerősítésével próbáltuk elérni. Ezért a pikolínium gyűrűre szulfonil szubsztituenst helyeztünk (37. ábra, (a) eset), mellyel vörös irányú 25-65 nm-es eltolódást váltottunk ki.⁷⁴ Másik megközelítésként a konjugált rendszer kiterjesztése lehetséges, pl. a pikolínium elem lepidínium vázra való cseréjével (37. ábra, (b) eset).



37. ábra. A kutatócsoportunkban előállított mega-Stokes fluorofórok és *push-pull* konjugált rendszerek befolyásolásának két lehetősége.

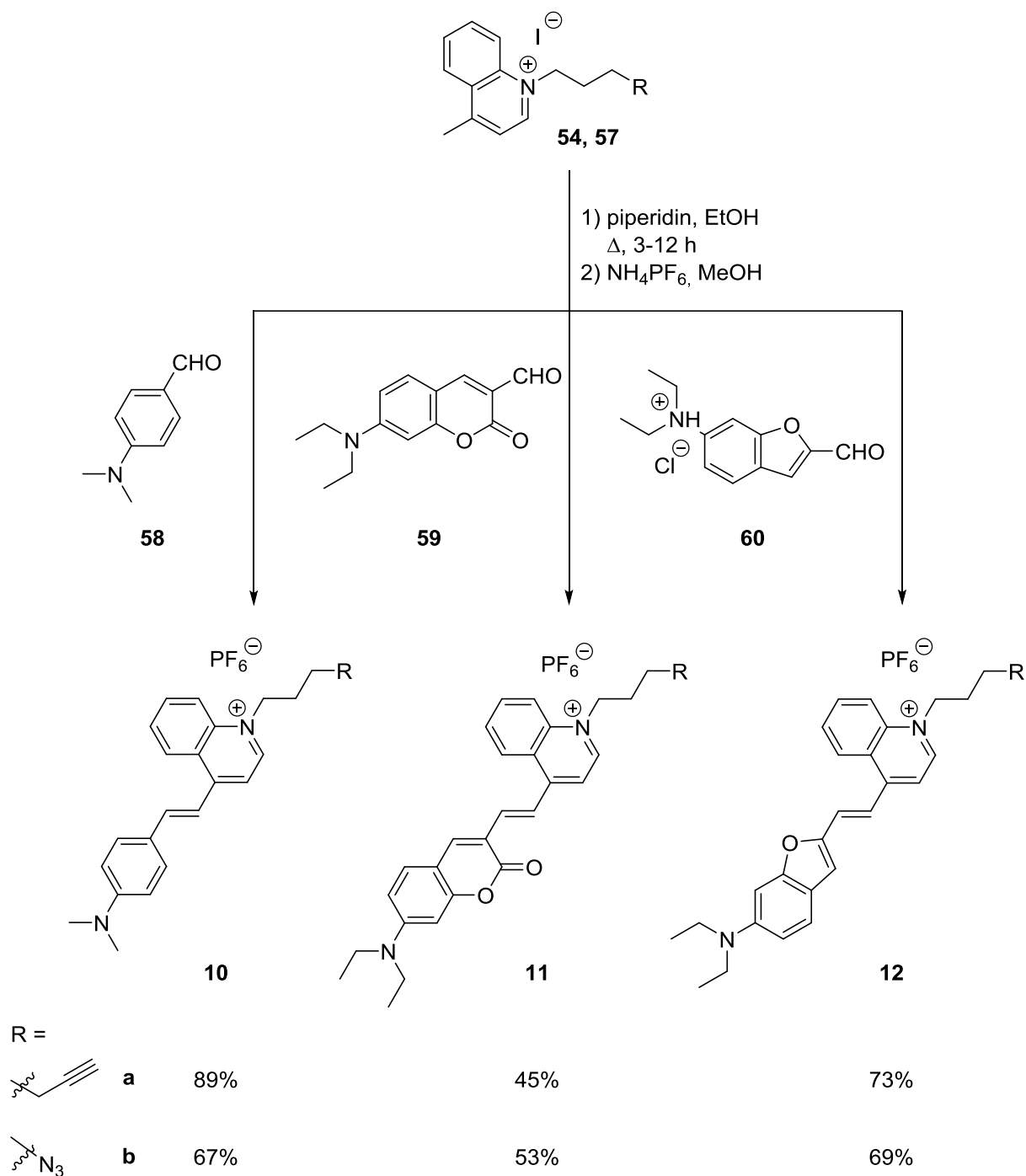
Hogy az így megtervezett **10**, **11** és **12** fluorofórok bioortogonális ligációban való felhasználásra is alkalmasak legyenek, a korábbiakhoz hasonlóan azid- illetve alkin funkciós csoportokkal kívántuk funkcionalizálni őket.

A szintézisek során a pikolínium származékok előállításával⁷⁴ analóg módon haladtunk. Elsőként lepidin (4-metilkinolin, **52**) 6-jód-hex-1-innel (**53**) való alkilezésével az alkin funkciót tartalmazó közös **54** lepidínium (4-metilkinolínium) vázelemet alakítottuk ki. Az alkilezést 1,3-dijódpropánnal (**55**) elvégezve, majd a kapott **56** köztiterméken jód – azid cserét végrehajtva vittük be az azid funkciós csoportot és alakítottuk ki az **57** lepidínium származékot (38. ábra).



38. ábra. A fluorofórok közös lepidínium vázelemeinek előállítása

A fluorofórok előállításához az **54** és **57** lepidínium sókat, azok 4-metil csoportjának savas karakterét kihasználva, aldehidekkel báziskatalizált kondenzációs reakcióba vittük. Ennek alapján a kapcsolási reakciót az **58** benzaldehid-, **59** kumarin-aldehyd-, illetve **60** benzofurán-aldehyd származékokkal végeztük el etanolban, reflux hőmérsékleten, katalitikus mennyiségű piperidin jelenlétében (38. ábra). Mivel a kiindulási sók és az egyes termékek nagyon hasonló elúciós tulajdonsággal bírnak, a könnyebb tisztíthatóság érdekében mindhárom esetben a megfelelő aldehidet feleslegben (1,5 – 3 ekv.) használtuk és VRK-n követve a lepidínium teljes konverziójáig kevertettük a reakcióelegyeket. Az oszlopkromatográfiás tisztítás után a jodid aniont az élő sejtek számára jobban tolerálható hexafluorofoszfátra cseréltük. Az ellenion cseréjéhez a termékeket acetonitrilben vagy metanolban oldottuk és nagy mennyiségű NH_4PF_6 hozzáadása után még egy-egy órán át kevertettük szobahőmérsékleten. Az oldószer eltávolítása után a visszamaradt szilárd anyagokat desztillált vízben szuszpendáltuk, a kivált kristályos termékeket szűrtük és desztillált vízzel a sófelesleg teljes eltávolításáig mostuk. Így jutottunk közepes – jó termeléssel a **10**, **11** és **12** céltermékekhez. Az aldehidek közül a 4-(dimetilamino)benzaldehydet (**58**) a kereskedelmi forgalomból szereztük be, a 7-(diethylamino)-3-formilkumarint (**59**)⁸⁹ és a 6-(diethylamino)benzofurán-2-karbaldehydet,⁹⁰ pontosabban annak hidroklorid sóját (**60**) pedig az irodalomban leírt módhoz hasonlóan állítottuk elő.



39. ábra. A 10, 11 és 12 lepidinium-vázás fluorofórok előállítása.

Bár a fenti reakciósor kielégítő eredménnyel működött 50 – 200 mg jelzővegyület előállításakor és az alkalmazott oszlopkromatográfias módszerek megfelelő tisztaságot biztosítottak, a fluorofórok későbbi, kereskedelmi forgalmazása során (Luminochem kft., <http://luminochem.com>) igény nyílt grammos méretben való előállításukra is. Ehhez a reakciók hasznos konverziójának növelésére és a tisztítási lépések során elvesztett termék

menyiségének csökkentésére volt szükség. Továbbá, a melléktermékek zavaró elúciós tulajdonságai miatt az oszlopkromatográfiás tisztítás elkerülése is kívánatos volt. A reakciókörülmények optimalizálásával (felhasznált reagens feleslege, reakcióidő) az **54** és **57** lepidínium vázelemekhez vezető lépések hozamát 86%, illetve 84%-ra sikerült javítani körülbelül 3 – 5 g tiszta termék izolálása mellett. A **10**, **11** és **12** jelzővegyületek előállításakor egységesen 3 ekvivalens aldehidet felhasználva a reakciók 2,5 – 3 óra alatt lejáródtak (VRK-s követés alapján), ekkor leállítva a reakciókat a bomlásból eredő melléktermékek keletkezése részben kiküszöbölhető volt. Az oldószer eltávolítása után a visszamaradt elegyet szilikapadra vittük, amiről DCM (**10**) vagy 1 V/V% MeOH/DCM (**11**, **12**) eluenssel az elreagálatlan aldehid részben (1,2 – 1,6 ekvivalens) visszanyerhető volt. A következő lépésben a terméket 10 V/V% MeOH/DCM oldószerrel tudtuk a leragadó melléktermékek mellől lemosni. Az így kapott nyersterméket minimális mennyiségű EtOH/H₂O elegyében (**10**: 1/1 V/V; **11**, **12**: 2/1 V/V) oldottuk, majd kevertetés mellett 8 ekvivalens NH₄PF₆ tömény vizes oldatát csepegtettük hozzá. Ennek hatására szinte azonnal elkezdett kicsapódni a céltermék, melyet további 15 perc kevertetés után kiszűrtünk. A szűrőn kevés (a feloldáshoz szükséges oldószer kb. 10%-ával) EtOH/H₂O eleggyel mostuk, majd desztillált vízzel addig, amíg a lecsöpögő, kezdetben színtelen szűrlet rózsaszín-pirosas színűvé nem vált, ezzel jelezve, hogy már nem tartalmaz fölös PF₆⁻ anionokat. (A lepidínium vegyületek hexafluorofoszfát sóinak vízben való oldhatósága annyival rosszabb a jodid elleniont tartalmazó változatokénál, hogy ha van fölös PF₆⁻ anion a rendszerben, akkor szinte nem is oldódnak és színtelen oldatot kapunk.)

Céltermék	10	11	12
a (alkin)	95%	90%	93%
b (azid)	85%	73%	87%

10. táblázat. Az egyes jelzővegyületek optimalizált előállításakor elért termelések.

Ezzel az eljárással egyszerre 1-2 g festéket tudtunk gyorsan és egyszerűen előállítani, azid esetében 70%-85%-os, alkin esetében 90-95%-os termeléssel (10. táblázat). Az így kapott céltermékek tisztasága LC-UV/VIS és LC-MS alapján minden esetben 97% fölötti volt, de többször 99% feletti értéket is elért, azaz további tisztítást nem igényeltek.

5.3.2. Spektroszkópiai vizsgálatok

Vizsgáltuk az előállított jelzővegyületek fotofizikai paramétereit (abszorpciós, gerjesztési és emissziós hullámhossz-maximumok, Stokes-eltolódás, moláris abszorpciós koefficiens, fluoreszcens kvantumhasznosítási tényező és fluoreszcenciás élettidő). Az eredményeket a 11. táblázat foglalja össze. Az alkin-, illetve azid-funkcionalizált vegyületepárok (mérési hibán belül) minden adata megegyezett, így külön nem kerülnek feltüntetésre. A kvantumhasznosítási tényezők és fluoreszcenciás élettidők meghatározását Dr. Demeter Attila (MTA TTK, Anyag- és Környezetkémiai Intézet) végezte, krezilibolya referencia fluorofórt használva.⁹¹

Fluorofór	10	11	12
λ_{\max} (abs) / nm ^[a]	553	549	602
$\epsilon^{[a, c]}$ / 10 ⁴ M ⁻¹ cm ⁻¹	4,0	2,7	3,5
λ_{\max} (exc) / nm ^[a]	560	579	655
λ_{\max} (exc) / nm ^[b]	545	554	643
λ_{\max} (em) / nm ^[a]	706	732	805
λ_{\max} (em) / nm ^[b]	695	712	798
Stokes-eltolódás / nm ^[a]	146	153	150
Stokes-eltolódás / nm ^[b]	150	158	155
$\Phi_F^{[a, f]}$ / %	0,77	9,0	0,07
$\Phi_F^{[d, f]}$ / %	0,33	3,00	0,055
$\Phi_F^{[e, f]}$ / %	0,13	0,80	0,04
τ_F / ps ^[d, g]	50	200	90

[a] DMSO-ban. [b] MeOH-ban. [c] A λ_{\max} (abs) hullámhosszán mérve. [d] 50 V/V% DMSO/H₂O elegyben.

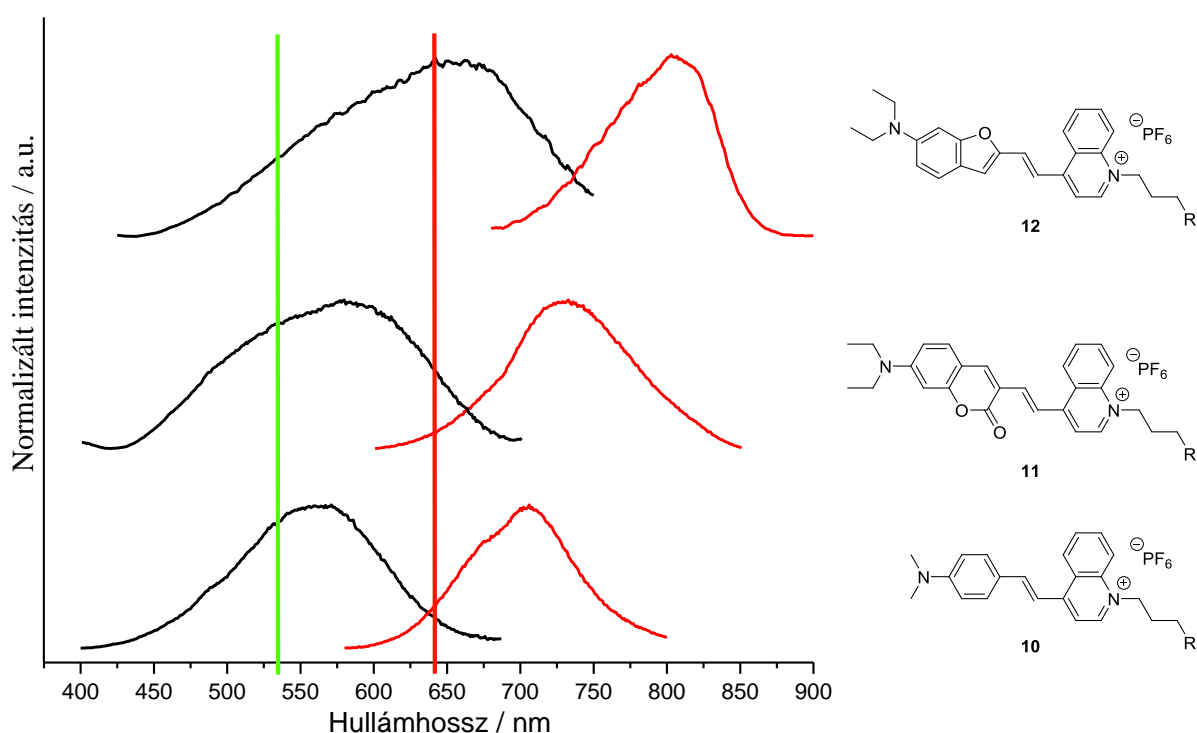
[e] 10 V/V% DMSO/H₂O elegyben. [f] Krezilibolya MeOH-ban vett értéke ($\Phi_F = 0,54$)⁹¹ alapján meghatározva.

[g] 750±20 nm-es tartományban mérve.

11. táblázat. Az előállított fluorofórok (10, 11, 12) spektroszkópiai tulajdonságai.

A kapott adatok alapján elmondható, hogy sikerült elérni célunkat, a lepidínium váz beépítése a várákozásnak megfelelően minden esetben a gerjesztési és emissziós spektrumok maximumának vörös irányú eltolódását eredményezte, valamint mindhárom esetben a Stokes-

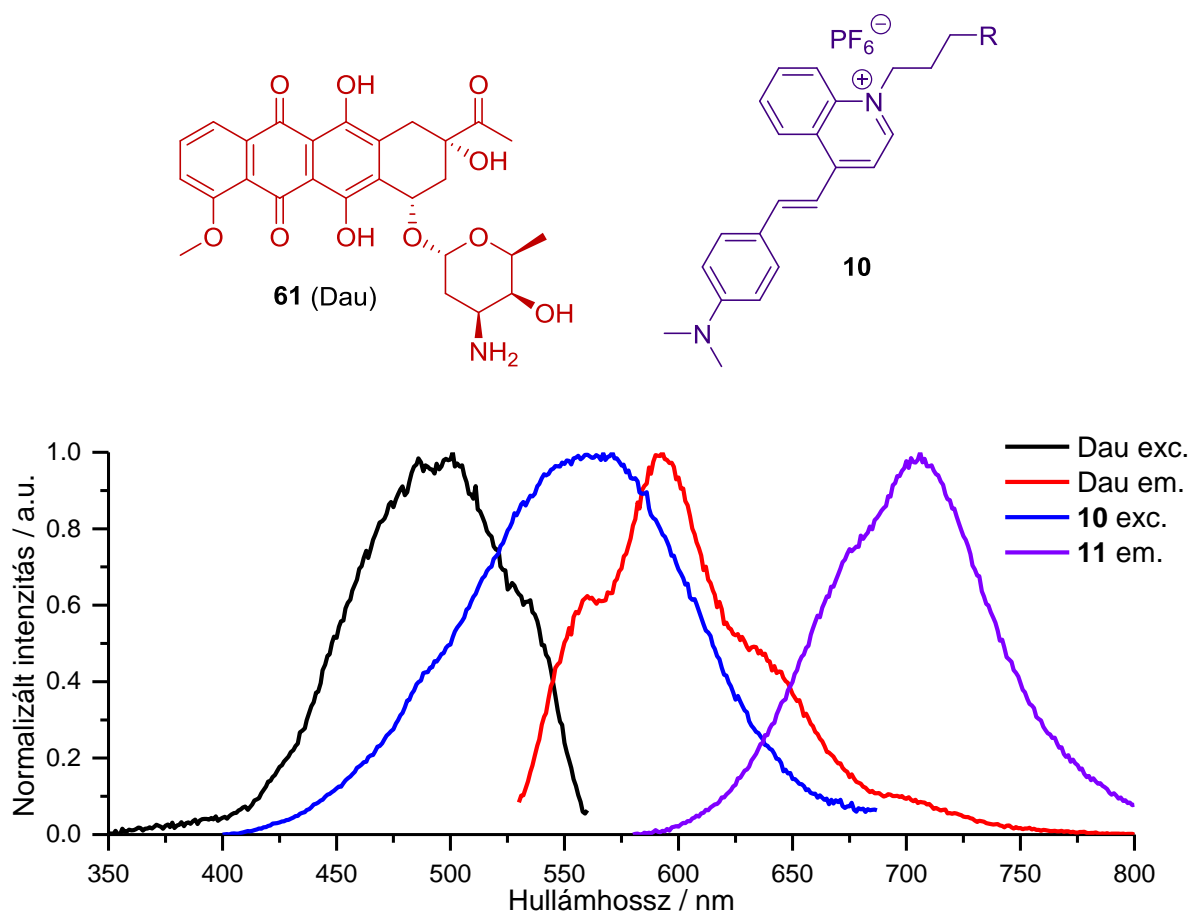
eltolódás további növekedését is megfigyelhettük. Ezzel a távoli vörös (**10**) – közeli IR tartományban (**11**, **12**) emittáló, mega-Stokes tulajdonsággal (150 nm körüli Stokes eltolódással) rendelkező fluoreszcens jelzővegyületeket állítottunk elő. A nagy Stokes-eltolódásnak köszönhetően a gerjesztési és emissziós sávok jól szétválnak, aminek köszönhetően az önabszorpció gyakorlatilag elhanyagolható (40. ábra). További kedvező sajátosságuk, hogy a **10** és **11** fluorofórok gerjeszthetők a nagy hatékonyságú és viszonylag olcsó 532 nm-es zöld dióda-pumpált szilárdtest lézerrel (*diode-pumped solid-state laser*, DPSSL), a **12** fluorofór pedig kompatibilis az ugyancsak elterjedten használt 625 nm-es piros dióda lézerrel, illetve a kiemelkedő fénysűrűségű 640 nm-es vörös DPSSL-rel (40. ábra, zöld és piros függőleges vonalak).



40. ábra. A gerjesztési és emissziós spektrumok a zöld és vörös DPSSL-ek hullámhosszával.

5.3.3. FRET rendszer kialakítása

Az előállított fluorofórok nagy Stokes-eltolódását kihasználó vizsgáltuk azok FRET rendszerben való alkalmazhatóságát egy fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkező rákellenes szert, a daunomicint^{92,93} (Dau, **61**) tartalmazó konjugátum segítségével. A daunomicin magas toxikussága miatt szabad formában nem, csak az egészséges sejtekre való mérgező hatását csökkentő, rákos sejteket szelektíven megcélzó konjugátumokhoz kötve használható.⁹⁴⁻⁹⁶ Jelenlegi ismereteink szerint azonban a rákos sejtek elpusztításáért nem a teljes konjugátumok, hanem a sejteken belül felszabaduló szabad daunomicin molekulák felelősek.⁹⁴⁻⁹⁹ Az erre a hatásmechanizmusra épülő hipotézis vizsgálatához a daunomicin felszabadulását fluoreszcensen, időben dinamikusan követhetővé tevő FRET rendszer kialakítását terveztük. Ennek felhasználásával a hordozóhoz kötött Dau tompított fluoreszcenciája a vegyület felszabadulásával egy időben újra megjelenne, vagyis a Dau töltene be a donor és egy ideálisan megválasztott fluorofór pedig az akceptor szerepét.

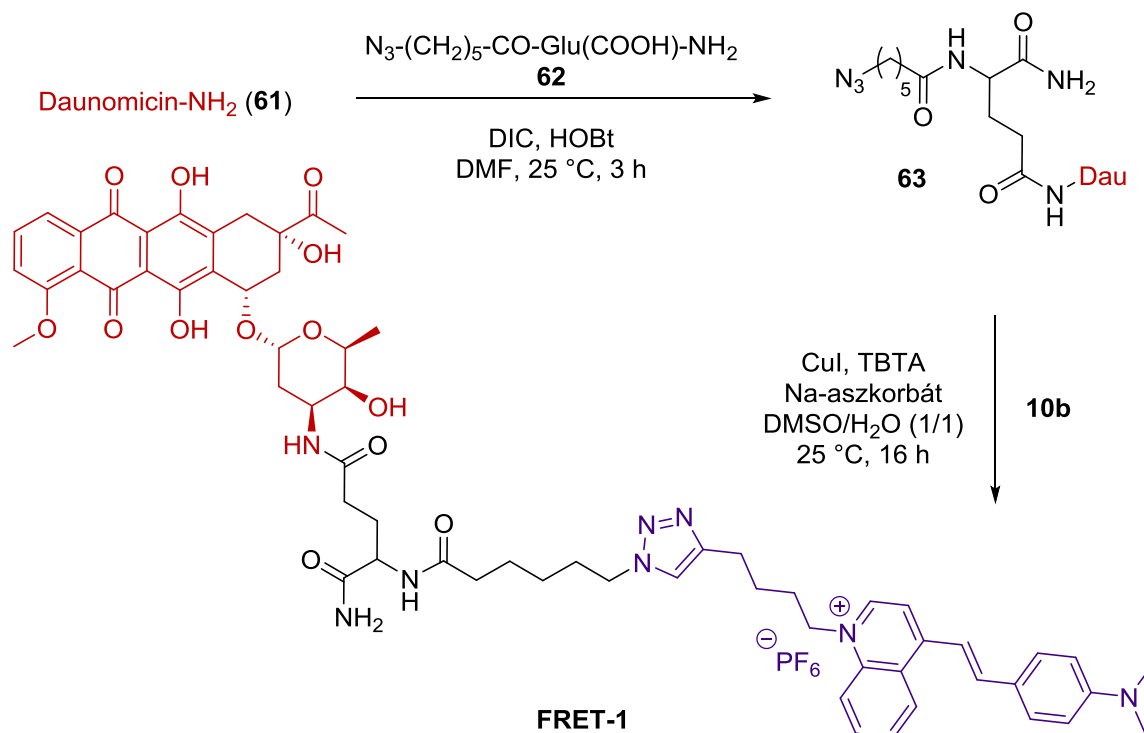


41. ábra. A daunomocin (**61**) és a választott lepidinium fluorofór (**7**) szerkezete (felül), valamint normalizált gerjesztési és emissziós spektrumaik (alul).

A megfelelő akceptor kiválasztása során a nehézséget a daunomicin spektrofotometriai tulajdonságai jelentik, ugyanis a széles gerjesztési és emissziós spektrumai nem teszik lehetővé hagyományos (kis Stokes-eltolódással rendelkező) fluorofórok alkalmazását. A megoldást olyan mega-Stokes fluorofór jelentheti, ami az 550-650 nm-es tartományban gerjeszthető (a Dau emissziója), és 580 nm körül (a Dau emissziós hullámhossz maximuma) nincs saját fluoreszcenciája. Megvizsgálva az általunk előállított **10**, **11** és **12** fluorofórokat a kívánalmaknak megfelelő legjobb egyezést a **10** lepidínium jelzővegyület mutatta (41. ábra).

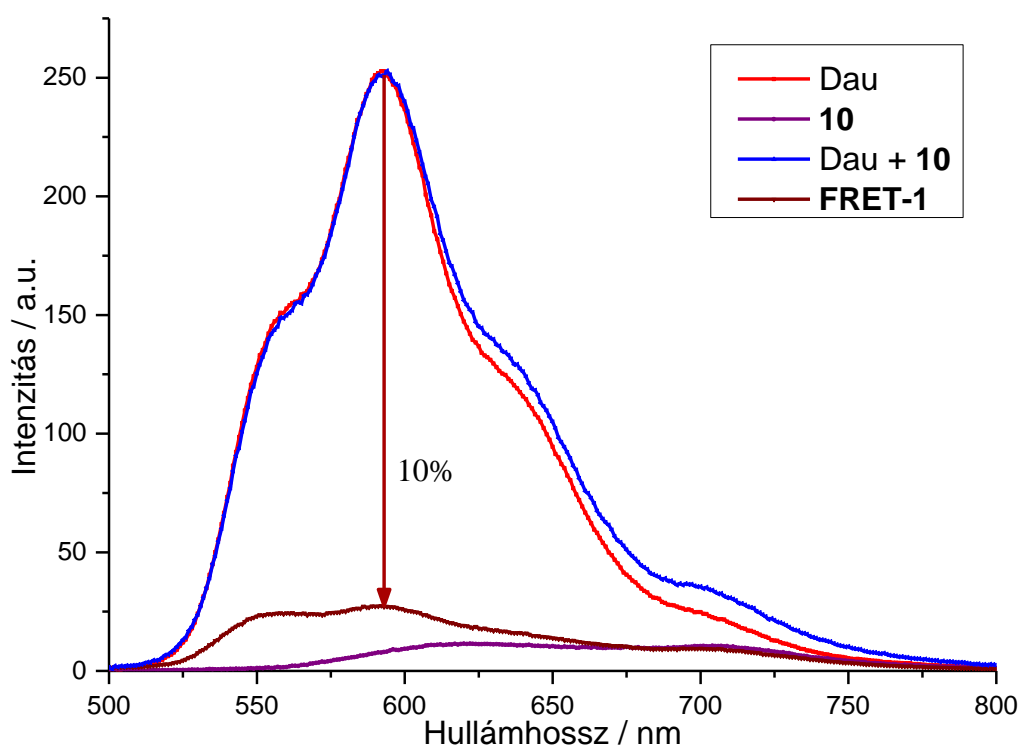
A FRET rendszerek kialakításakor a szilárd fázisú peptidszintéziseket Enyedi Kata Nóra doktorandusz végezte az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban standard módszerek alkalmazásával. A részletes kísérleti körülmények megtalálhatóak a jelen értekezés alapjául szolgáló, mellékelt publikációban (Cserép *et al.* Chem. Asian J., 2013).

A FRET rendszerek vizsgálatához elsőként egy olyan modell rendszert építettünk fel, melyben a két fluorofór egységet egy glutaminsavra épülő linker kötött össze (42. ábra). Ehhez a daunomicint (**61**) aminosocportján keresztül 6-azidohexánsavval (**27**) módosított glutaminsav (**62**) oldalláncán lévő szabad karboxilcsoporthoz kapcsoltuk, majd a **10b** jelzővegyületet a **63** vegyülethez rézkatalizált azid-alkin cikloaddícióval kötve kaptuk a **FRET-1** modell konjugátumot.



42. ábra. A **FRET-1** konjugátum előállítása.

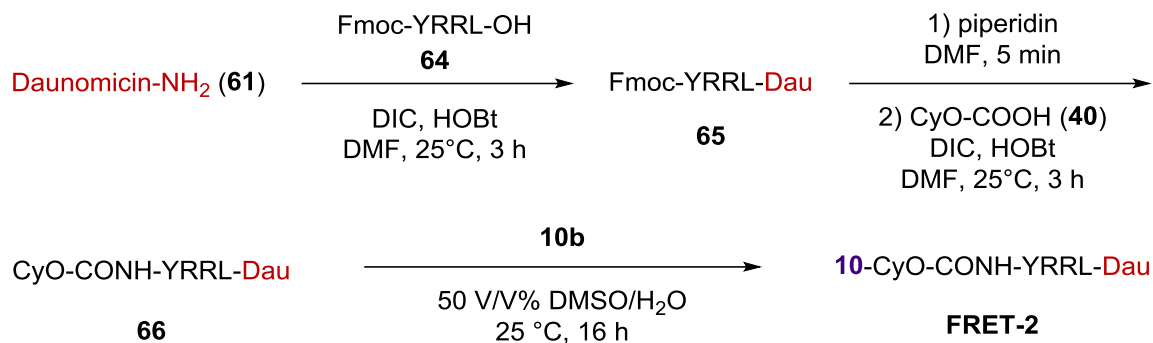
A spektrofotometriai vizsgálatok azt mutatták (43. ábra), hogy a daunomicin fluoreszcens intenzitására csak akkor volt hatással a lepidínium fluorofór, ha azok a konjugátumnak köszönhetően térben közel helyezkedtek el egymáshoz. Az fizikai összekeverés a fluoreszcens spektrumok egyszerű összegződésével járt, azonban a FRET-1 konjugátum esetében 592 nm-en (a Dau emissziós hullámhossz maximumán) az intenzitás 90%-kal csökkent. Ezzel párhuzamosan a 706 nm-en (a **10** emissziós hullámhossz maximumán) az intenzitás növekedését vártuk, ennek hiánya a két fluorfór egy nagyságrenddel eltérő kvantumhasznosítási tényezőjével magyarázható.



43. ábra. A Dau (piros), a **10** (lila), a Dau + **10** fluorfór keverék (kék) és a FRET-1 (barna) emissziós spektrumai, $c = 10^{-6}$ M, 50 V/V% DMSO/H₂O elegy, $\lambda_{exc} = 480$ nm.

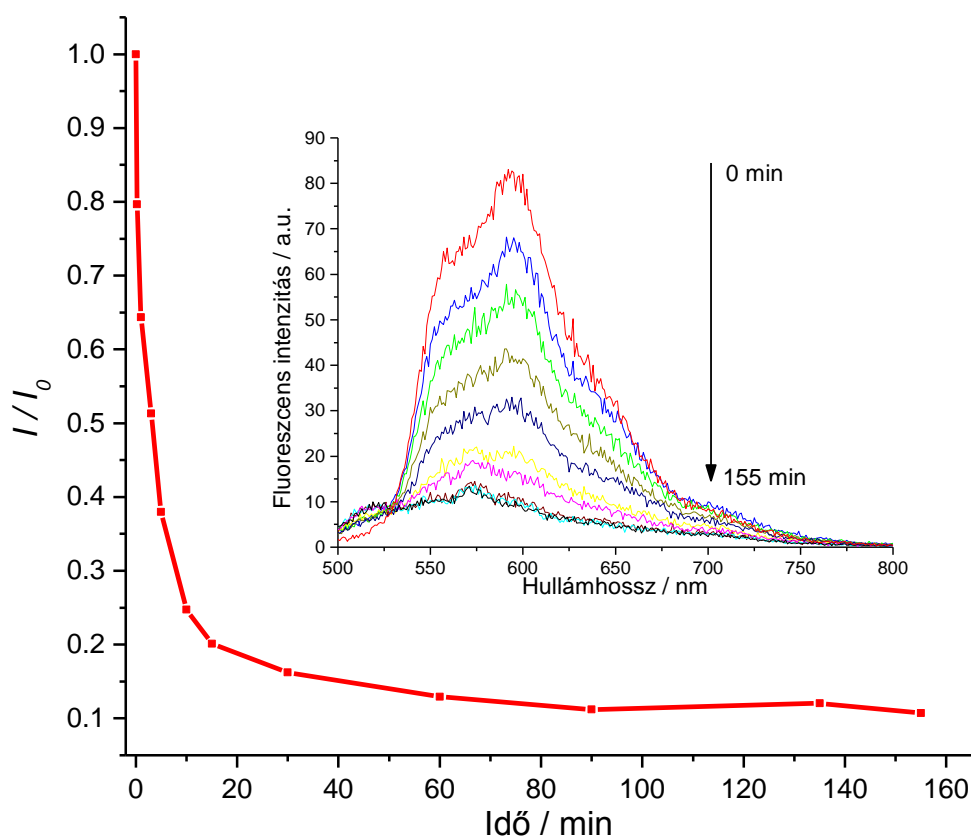
A kapott eredmények alapján a **10** fluorofór jó hatásfokkal törli le a Dau fluoreszcenciáját. A következő lépésben a daunomicin emissziójának visszanyerhetőségét vizsgáltuk, melyhez egy tetrapeptidre épülő konjugátumot terveztünk. Az YRRL tetrapeptid motívumot azért választottuk, mert katepszin B enzimmel hidrolizálható a két arginin aminosav között.⁹⁷ Ezt kihasználandó, az *N*-terminálisán Fmoc csoporttal védett **64** peptidlánc gyantáról való hasítás után szabad C-terminálisához a daunomicint (**61**) amid kötés kialakításával kapcsoltuk (**65**). Az Fmoc védőcsoport piperidinnel való eltávolítása után a peptidet CyO (**40**) ciklooktinnal

módosítottuk (**66**), majd a **10b** jelzővegyületet rézmentes azid-alkin cikloaddícióval beépítve jutottunk a **FRET-2** konjugátumhoz (44. ábra).



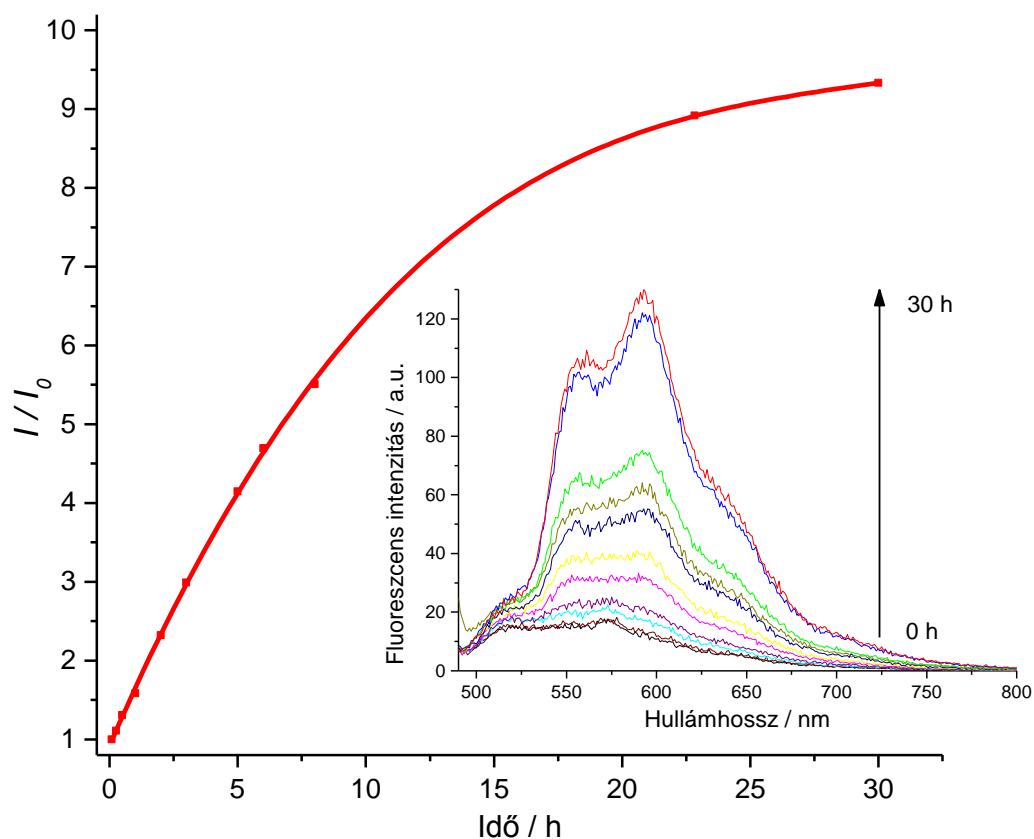
44. ábra. A **FRET-2** konjugátum előállítása.

Az utolsó lépést megismételtük úgy, hogy közben fluoreszcencia 592 nm-en való intenzitásának változását is mértük, ezzel követve a konjugátum felépülését (45. ábra). A reakció relative gyors lefolyása (1 óra) mellett a várakozásainknak megfelelően a Dau emissziója ebben az esetben is jelentősen csökkent, az eredeti érték kb. 10%-ára esett vissza.



45. ábra. A fluoreszcens intenzitás változása 592 nm-en a CyO-CONH-YRRL-Dau + **10a** reakció során, 5 V/V% DMSO/H₂O elegy, $\lambda_{exc} = 480$ nm.

A fluoreszcens jel visszanyerésének tanulmányozásához a két fluorofórt tartalmazó **FRET-2** szubsztrát pufferben való oldatához katepszin B enzimet adtunk és a követtük a reakcióelegy fluoreszcenciájának változását (46. ábra). Az enzimatis hasítás előrehaladtával arányosan az emissziós intenzitás 10-szeres növekedését tapasztaltuk, azaz a daunomicin fluoreszcenciája teljes mértékben visszaállt a kiindulási állapotba. A kontrollkísérlet során (enzim nélkül) az intenzitás nem változott.

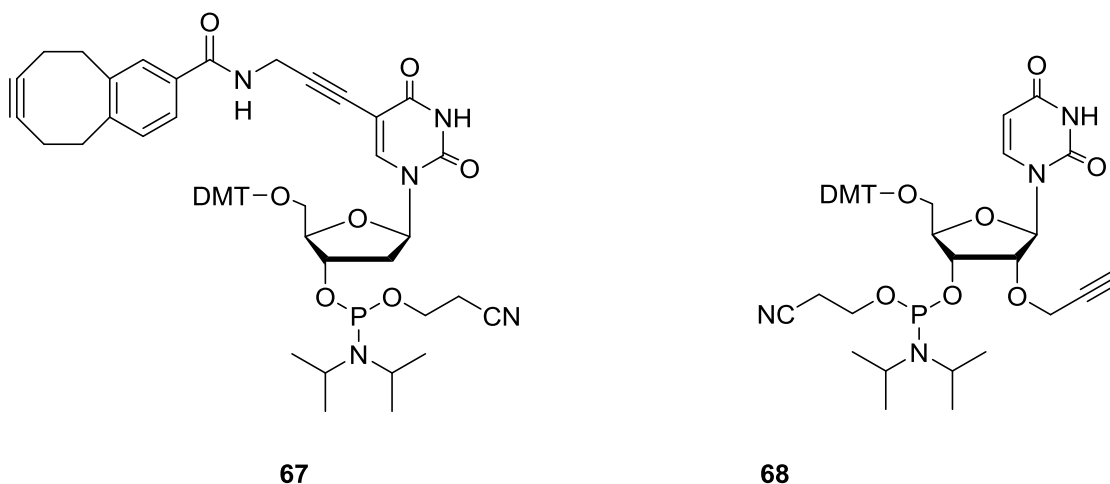


46. ábra. A fluoreszcens intenzitás változása 592 nm-en a **FRET-2** katepszin B-vel való kezelése során, pH=5 puffer (0,1 M NaOAc; 0,01 M DTT; 0,002 M EDTA), $\lambda_{exc} = 480$ nm.

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az alkalmazott lepidínium fluorofór segítségével hatékonyan tudtuk modulálni a daunomicin fluoreszcenciáját fiziológias körülmények között és a daunomicin felszabadulása várhatóan *in vivo* körülmények között is nyomon követhető lesz. Az ez irányba való kísérletek, és a Dau felszabadulásának sejthalálra gyakorolt hatásának vizsgálata jelenleg is folyamatban vannak.

5.3.4. Oligonukleotid fluoreszcens jelölése

A kifejlesztett lepidínium-vázás fluorofórokat egy párhuzamosan folyó kutatási témában DNS-jelölésre is fel kívántuk használni. Ennek során célunk a reaktív COMBO (**42**) ciklooktinnal módosított oligonukleotid lánc előállítása volt, melyhez a jelölési lépés során gyűrűfeszültség által kiváltott azid-alkin cikloaddíciós reakcióban tudjuk a választott, azid funkciós csoporttal rendelkező fluoreszcens jelzővegyületet kapcsolni. Az oligonukleotidok fluorofórokkal történő jelölése terén tervünk volt a jelzővegyületek beépítési pozíciójának változtatása és ennek a fluoreszcenciára, illetve a kétszálú DNS láncokra való hatásának vizsgálata is. Ezért előállítottuk a dezoxiuridin uracil egységének COMBO-val (**67**), illetve az uridin ribóz egységének 2'-hidroxilcsoportján propargil csoporttal funkcionalizált nukleotidok foszforamidit származékait (**68**) (47. ábra).¹⁰⁰

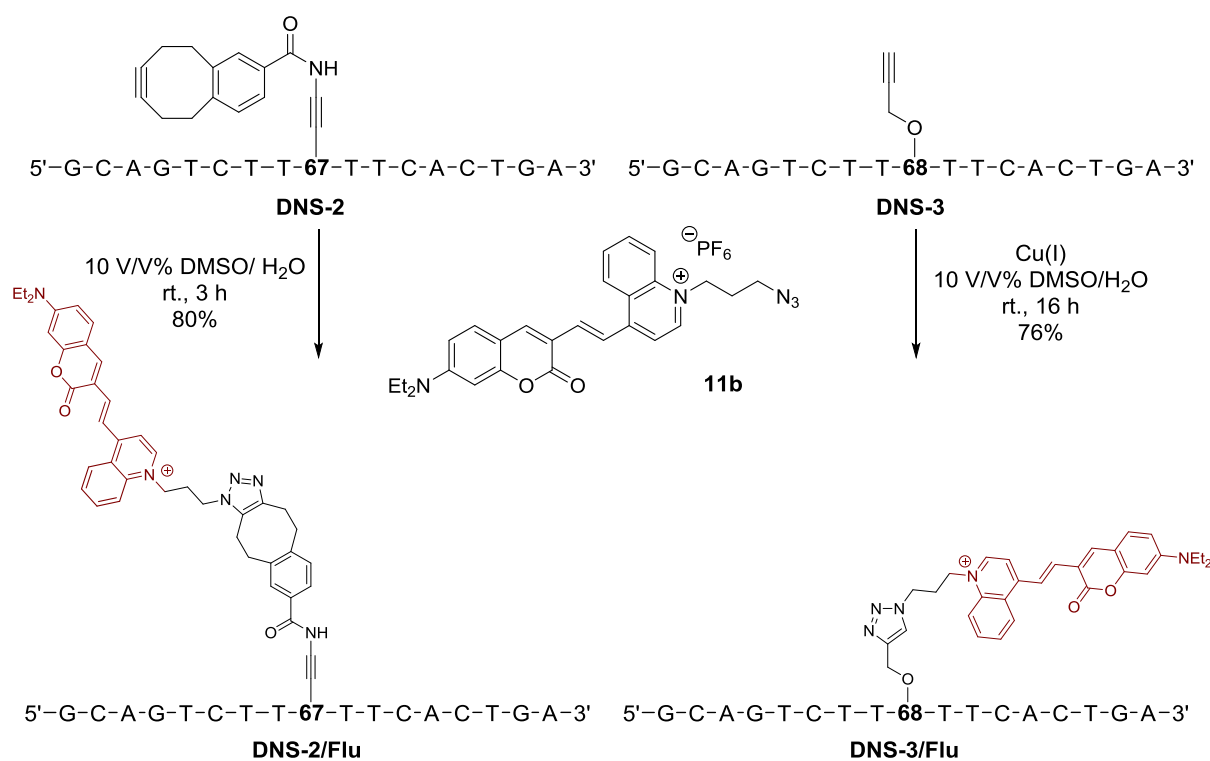


47. ábra. Alkin funkcionizált dezoxiuridin építőelemek szintézise.

Az 5-ös pozícióban ciklooktinnal módosított **67** és a 2' helyzetben terminális acetilént tartalmazó **68** építőelemek oligonukleotid láncba való beépítését, majd azok fluoreszcens jelölését, a termékek karakterizálását és vizsgálatát, illetve a komplementer szálak szintézisét Dr. Claudia Stubinitzky végezte prof. Wagenknecht kutatócsoportjában (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Németország). A standard szilárd fázisú oligonukleotid szintézis és a vizsgálatok részletes kísérleti körülményei a jelen értekezés alapjául szolgáló, mellékelt publikációban (Stubinitzky *et al.* Chem. Commun, 2014) találhatók meg.

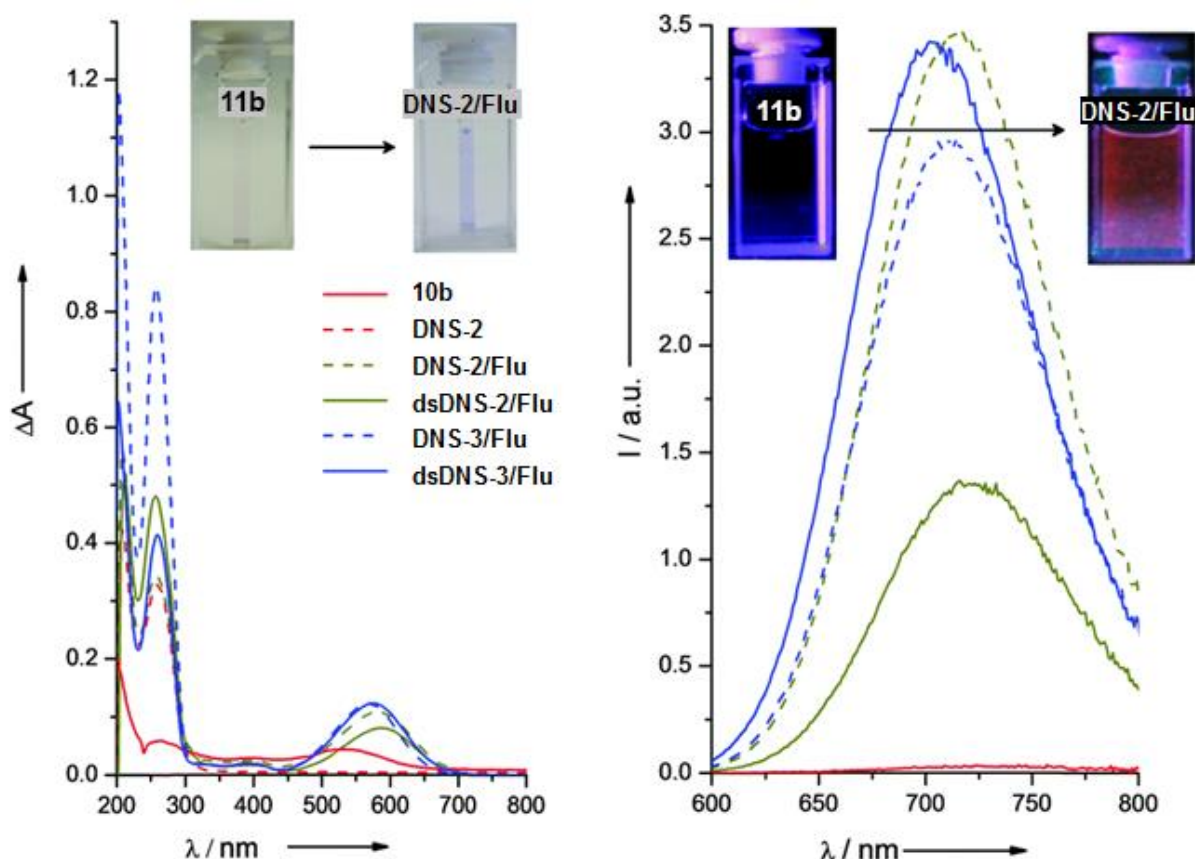
Automatizált szilárd fázisú kémiával az 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**67**-T-T-C-A-C-T-G-A-3' (**DNS-2**) és az 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**68**-T-T-C-A-C-T-G-A-3' (**DNS-3**) oligonukleotid láncokat, illetve ezek közös komplementer szálát (**DNS-k**) állítottuk elő. A következő lépésben

a COMBO-t tartalmazó **DNS-2**-höz rézmentes, a **DNS-3**-hoz pedig rézkatalizált azid-alkin cikloaddícióval kapcsoltuk a **11b** kumarinvázis lepidínium fluorofórt (48. ábra), így nyerve a **DNS-2/Flu** és **DNS-3/Flu** fluoreszcensen jelzett oligonukleotidokat.



48. ábra. **DNS-2** és **DNS-3** jelölése **11b**-vel valamint a **DNS-2/Flu** és **DNS-3/Flu** termékek.

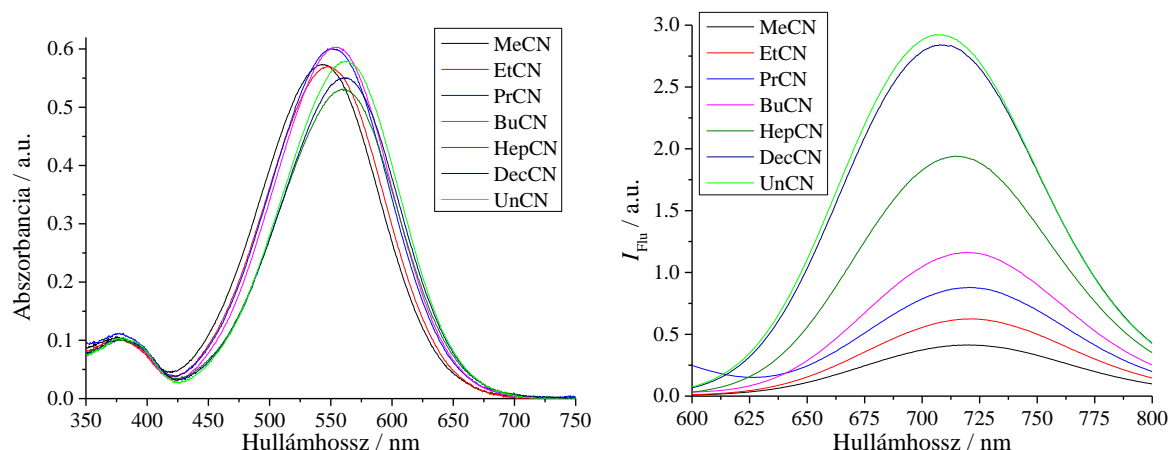
A jelölt DNS szálaknak felvettük abszorbancia és fluoreszcencia spektrumait, majd a megfelelő komplementer szállal való hibridizáció után a kétszálú láncoknak (**dsDNS-2/Flu**, **dsDNS-3/Flu**) is meghatároztuk spektroszkópai tulajdonságait (49. ábra) és olvadási hőmérsékletüket. A **DNS-2** szál **11b**-vel történő jelölési reakciójában bekövetkező, szemmel is jól látható színváltozást (pirosból kékbe) az abszorbancia spektrum is jól tükrözte (49. ábra, baloldal), ugyanis jelzővegyülethez tartozó abszorpciós maximum 535 nm-ről 584 nm-re tolódott. Ennél is jelentősebb változás, hogy az emissziós maximum kisebb mértékű kék irányú eltolódása mellett a fluoreszcencia intenzitása körülbelül 130-szorosára nőtt. A 2'-pozícióban módosított **DNS-3/Flu** esetében hasonlókat tapasztaltunk, az abszorpciós és emissziós maximumok eltolódása mellett az utóbbi intenzitása szintén hasonló mértékben változott (49. ábra).



49. ábra. A jelzővegyület és az oligonukleotidok UV/Vis abszorpciós (bal) és fluoreszcens (jobb) spektrumai azonos koncentráció mellett, 10 mM NaPi pufferben (pH = 7). Szabad **11b** fluorofór (folytonos piros); jelöletlen **DNS-2** (szaggatott piros); jelölt **DNS-2/Flu** és kétszálú **dsDNS-2/Flu** (szaggatott és folytonos zöld); jelölt **DNS-3/Flu** és kétszálú **dsDNS-3/Flu** (szaggatott és folytonos kék). $\lambda_{exc} = 590 \text{ nm}$, $\lambda_{em}(\mathbf{10b}) = 732 \text{ nm}$, $\lambda_{em}(\mathbf{DNS-2/Flu}) = 715 \text{ nm}$, $\lambda_{em}(\mathbf{dsDNS-2/Flu}) = 722 \text{ nm}$, $\lambda_{em}(\mathbf{DNS-3/Flu}) = 711 \text{ nm}$, $\lambda_{em}(\mathbf{dsDNS-3/Flu}) = 704 \text{ nm}$.

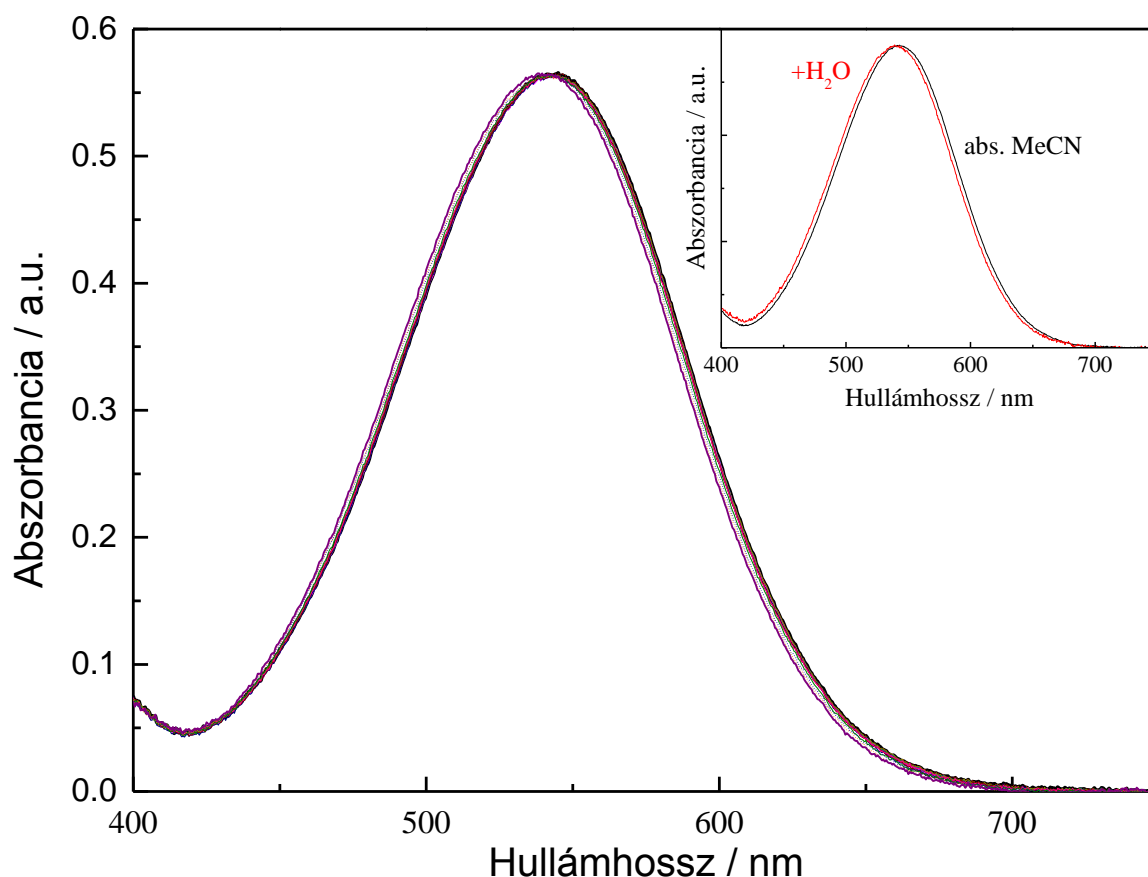
A tapasztalt jelenség hátterében a jelzővegyület körüli lokális polaritás megváltozását sejtettük és a pontosabb megértéséhez a **11** fluorofórt mélyebb spektroszkópai vizsgálatoknak vetettük alá, melyek során tanulmányoztuk a vegyület abszorpciós és emissziós tulajdonságait különböző polaritású nitril típusú oldószerekben (50. ábra). A polaritás csökkenésével (és az ezzel egybeeső törésmutató növekedéssel) az abszorpciós hullámhossz-maximum konzisztensen a vörös irányba tolódott el, míg az emissziós ezzel párhuzamosan a kék tartomány felé. A Stokes-eltolódás szolvatokromizmusából Dr. Demeter Attila segítségével meghatároztuk az alap és gerjesztett állapotok dipólusmomentumai közötti különbséget. A számítások alapján az alapállapotban is viszonylag nagy dipólusmomentum irányultsága a gerjesztés során megfordul és jelentősen megnő, vagyis az oldószer polaritásának valóban nagy

hatása van arra, hogy a közeg mennyire tudja stabilizálni az egyes állapotokat. Ennek alapján a **11b** fluorofór oligonukleotid lánchoz való kötése során bekövetkező vörös irányú abszorbancia- és kék irányú fluoreszcencia-eltolódás a lokális környezet polaritásának csökkenésével magyarázható. A Frank-Condon állapotok kevésbé poláris környezetben való megváltozásával (az ún. energiakülönbség törvény, *energy-gap law*)¹⁰¹ pedig csökken a belső konverzióval való relaxáció sebessége, így a fluoreszcencia intenzitás növekszik.



50. ábra. A **11** fluorofór szolvatokromizmusa UV/Vis abszorbancia (bal) és fluoreszcencia (jobb) mérések alapján különböző nitril típusú oldószerekben.

Vizsgáltuk a vízzel kialakítható H-hidak hatását is a jelzővegyület fotofizikai viselkedésére. A **11** fluorofór száraz acetonitriles oldatához növekvő mennyiségű vizet adva az abszorpciós hullámhossz maximum a kék irányba tolódott az abszorpciós egy idejű növekedésével (51. ábra). A fluoreszcens kvantumhasznosítási tényező ezzel szemben a vízzel kölcsönhatásba lévő molekulák számának emelkedésével folyamatosan csökkent. Mivel oligonukleotidhoz való konjugáció csökkenti a víz szerepét, ezáltal a belső konverzió lehetőségét,¹⁰² az emissziós intenzitás növekedése részben a víz kiszorításával járó H-kötések megszűnésével is magyarázható. A jelölési vizsgálatok tapasztalata alapján az optikai tulajdonságokat az egyszálú DNS esetében a kapcsolódás pozíciója (5- és 2'-) nem befolyásolja számottevően.



51. ábra. A **11** fluoroför abszorpciója acetonitrilben vízzel való titrálás során (0 – 1,27 M).
A kis ábrán a kísérlet elején és végén felvett spektrumok láthatóak.

A két jelzett oligonukleotid lánc komplementer DNS-sel történő hibridizációja során viszont jelentős különbséget figyeltünk meg. Az anelláció hatására kialakuló kétszálú **dsDNS-2/Flu** esetében az abszorpció hullámhossz maximum pár nm-rel a kék irányba tolódott (közelebb a szabad fluoroforra jellemző értékhez) és az emissziós intenzitás lecsökkent, bár fontos megjegyezni, hogy a **11b** kiindulási értékéhez képest még mindig 50-szer nagyobb maradt. A **dsDNS-3/Flu** esetében nem tapasztaltunk hasonlókat, sőt az abszorbancia változatlansága mellett a fluoreszcencia intenzitása még kis mértékben növekedett is. A **dsDNS-2/Flu** esetében megfigyelt intenzitáscsökkenést az abszorpciós együttható csökkenése csak kis mértékben indokolja, és a fő okot a lánchoz való csatlakozási pontok közötti különbségben kell keresnünk. Ezt a különbséget támasztják alá az olvadási hőmérsékletek is. Míg ugyanis a **dsDNS-2/Flu** 58,2 °C-os olvadási hőmérséklete a módosítások nélküli referenciához (59,5 °C) képest 1,3 °C-kal alacsonyabb, addig a **dsDNS-3/Flu** 62,8 °C-os értéke meglepő módon 3,3 °C-kal magasabb. A fluoreszcencia- és stabilitás különbségek a jelzővegyület kettős spirálhoz viszonyított helyzetével magyarázhatóak. Az 5-ös pozícióban való módosításkor a fluoroför valószínűleg

elfele áll a kétszálú oligonukleotid száltól, ezáltal jobban ki van téve az oldószer (víz) hatásának, míg a 2' helyzetben való elhelyezkedés esetén inkább a spirál belseje felé helyezkedik el és aromás kölcsönhatás, illetve H-kötések segítségével plusz stabilizációt nyújt a kettős spirál szerkezetnek. Ezáltal a fluofór szerkezete merevebbé válik, ami szintén csökkenti a belső konverzióval való relaxáció arányát és magyarázattal szolgálhat a **DNS-3/Flu** és **dsDNS-3/Flu** fluoreszcencia intenzitásának kis különbségére.

*Összefoglalva eredményeinket elmondható, hogy sikeresen valósítottuk meg lepidinium alapú, a távoli-vörös – közeli IR tartományban emittáló fluoreszcens jelzővegyületek szintézisét. A fotofizikai vizsgálatok során kiderült, hogy ezek abszorpciós spektrumaik alapján optimálisak olcsó, kereskedelmi forgalomban elérhető lézerrel való gerjesztésre, és nagy Stokes-eltolódásuknak köszönhetően a gerjesztési és emissziós spektrumok szétválásával ideálisan használhatóak fel energiatranszfer rendszerekben. Ezt kihasználva, a **10** jelzővegyületet és a daunomicint, egy fluoreszcens rákellenes vegyületet tartalmazó modellrendszereket terveztünk, melyben a két fluorofór FRET kapcsolatban áll egymással. A kísérleti eredmények alapján a választott lepidinium fluorofór nagy hatékonysággal töri le a daunomicin fluoreszcenciáját, ezzel 90%-kal csökkentve annak emisszióját. Az összekötő egység hidrolízisével és így a két vegyület szétválasztásával a daunomicin fluoreszcenciája teljes mértékben visszaállíthatónak bizonyult. Az ígéretes eredmények alapján a jövőben olyan Dau-konjugátumok előállítását tervezzük, melyből a daunomicin felszabadulása in vivo körülmények között követhetővé válna, ezzel segítve a Dau felszabadulásának sejthalálra gyakorolt hatásának vizsgálatát, mechanizmusának megértését és hatékonyabb rákellenes szerek tervezését. Az előállított jelzővegyületek egy másik tagjával (**11**) alkin funkciós csoporttal ellátott oligonukleotidok fluoreszcens jelölését valósítottuk meg. A dezoxiuridin uracil egységének 5-COMBO, illetve az uridin ribóz egységének 2'-propargil módosításával vizsgáltuk jelzővegyület beépítési pozíciójának a fluoreszcenciára, illetve a kétszálú DNS láncokra való hatását. Mindkét esetben a fluoreszcens intenzitás nagymértékű növekedését értük el, azonban a komplementer szállal való anelláció hatására jelentős különbség mutatkozott. A jelenséget a fotofizikai kísérletek alapján a lokális polaritás megváltozásával magyarázhattuk, mely egyben rámutatott a fluoreszcens jelzés kapcsolódási pontjának fontosságára. Az eredmények és az olvadási hőmérsékletekben mutakozó különbségek alapján a komplementer szállal való hibridizáció után kialakuló kettős szálban a jelzővegyületek különböző pozíciójára következtethetünk.*

6. Kísérleti rész

6.1. Általános

A reakciók során felhasznált, kereskedelmi forgalomból származó vegyszereket, reagenset és oldószereket (Sigma-Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Fluka, Reanal vagy Molar Chemicals cégek termékei) további tisztítás nélkül használtam, az ettől eltérő eseteket külön feltüntettem. A száraz (absz.) oldószereket a kereskedelmi forgalomból szereztük be vagy a megfelelő szárítószerrel való desztillációval készülték.

A reakciókörülmények között feltüntetett hőmérsékletek, amennyiben szobahőmérsékletnél magasabbak, minden esetben az olajfürdő hőmérsékletét jelentik. Ha ez az érték magasabb az adott oldószer forráspontjánál, akkor a reakciót forráshőmérsékleten (az oldószer forráspontján) végeztük.

A reakciók vékonyréteg kromatográfiásan való követéséhez *Kieselgel 60 F₂₅₄* VRK-lapokat használtam (UV aktív, 254 nm, szilikagél, alumínium vagy üveg hordozó), UV detektálással (254/365 nm), illetve vizes kálium-permanganát vagy sósavas metanol előhívószert alkalmazásával. Az oszlopkromatográfiás tisztítást Merck *Silica Gel 60* szilikagélen végeztem, a deaktivált szilika előzetesen trietilamint tartalmazó eluensben való duzzasztást jelent. Az eluenseket változatos összetételük és arányuk miatt külön kerülnek feltüntetésre.

A kitermelés meghatározása előtt a szilárd anyagokat mindig vákuum alatt szárítottuk tömegállandóságig, az olajok esetében pedig 10-15 perces részletekben addig, amíg ennyi idő alatt 1 mg-nál nagyobb tömegcsökkenés már nem következett be.

A kapott kismolekulás termékek szerkezetét és tisztaságát NMR spektroszkópiával és HRMS mérésekkel igazoltuk. A ¹H- és ¹³C-NMR spektrumok *Bruker DRX 250 MHz*-es, *Varian VNMRs 600 MHz*-es vagy *Bruker Avance III 400 MHz*-es spektrométeren készültek, a kémiai eltolódások (δ) pedig ppm-ben szerepelnek az oldószer jelét használva referenciaként. A csatolási állandók (J) Hz-ben értendők. Felhasadások rövidítése: s (szinglett), d (dublett), t (triplett), q (kvartett), qn (kvintett), m (multiplett), br (széles). A pontos tömegmeghatározás (HRMS) *Agilent 6230 MS-TOF* tömegspektrométeren történt, a peptidszármazékok esetében (ESI) *Bruker Daltonics Esquire 3000+* ioncsapdás készüléket használtunk, az oligonukleotidok mérésére pedig (MALDI) *Bruker Daltonics Biflex-IV TOF* spektrométert használtunk.

A lepidínium-alapú fluoreszcens jelzővegyületek tisztaságának vizsgálatát *Shimadzu LCMS-2020* műszeren végeztük.

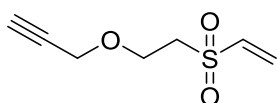
A kismolekulák karakterizálásához az IR-spektrumok *Bruker IFS55* és *Bruker Alpha-P* spektrométereken kerültek felvételre single-reflection gyémánt ATR fejjel, a sávok hullámszámban (cm^{-1}) értendők. Az olvadáspont *Bibby Scientific SMP10 Melting Point Apparatus* és *Büchi 501* készülékkel lett meghatározva és korrigálatlanok.

A spektrofotometriás vizsgálatokat *Jasco FP-6300* és *Varian Cary 100* spektrofotométereken, illetve *Varian Eclipse* és *Horiba Fluoromax 4* spektrofluorimétereken végeztük.

Az SDS-PAGE gélelektroforézis *PhastSystem* készüléken, PhastGel® nagysűrűségű gélen és PhastGel SDS puffer csíkok felhasználásával történt.

A DNS szintézishez az *Applied Biosystems Expedite Nucleic Acid Synthesizer System* készüléket használtuk, melyhez a reagens oldatok és szilád hordozók (*controlled pore glass*, CPG, 1 μmol) az ABI és a Glen Research cégek termékei. A 2'-*O*-propargil-uridin CED foszforamiditot (**69**) a ChemGenes-től vásároltuk.

6.2. Szintézisek



3-(2-(vinilszulfonil)etoxi)prop-1-in (**1**)

Egy inert védőgázzal (Ar vagy N_2) átöblített lombikban 120 μl (2,05 mmol, 1 ekv.) propargil-alkoholt (**13**) és divinil-szulfont (DVS, **14**) feloldottunk 15 ml vízmentes oldószerben. Ezzel párhuzamosan egy másik inertizált lombikban a bázist vízmentes oldószerben szuszpendáltuk, majd szobahőmérsékleten vagy 0 °C-on cseppenként a reakcióelegyhez adagoltuk. A reakciót VRK-n követve ($\text{MeOH/DCM} = 1/200 \text{ V/V}$) az alkohol teljes átalakulása után az oldószert rotációs vákuumbepárlón távolítottuk el. A visszamaradt barnássárga anyagot $5 \times 10 \text{ ml}$ etil-acetáttal extraháltuk, majd a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO_2 , $\text{MeOH/DCM} = 1/500 \text{ V/V}$). A termék színtelen olaj. A pontos beméréseket a 12. táblázat tartalmazza.

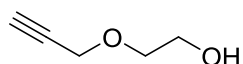
$R_f = 0,28$ ($\text{MeOH/DCM} = 1/500 \text{ V/V}$). IR: $\nu(\text{neat}) = 3269, 3060, 2877, 2116, 1612, 1445, 1386, 1358, 1311, 1126, 1095 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 6,70$ (1H, dd, $J = 16,6 \text{ Hz}$, 9,9 Hz); 6,38 (1H, d, $J = 16,6 \text{ Hz}$); 6,09 (1H, d, $J = 9,9 \text{ Hz}$); 4,14 (2H, d, $J = 2,3 \text{ Hz}$); 3,91 (2H, t, $J = 5,6 \text{ Hz}$); 3,26 (2H, t, $J = 5,6 \text{ Hz}$); 2,47 (1H, d, $J = 2,3 \text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3):

δ = 137,4; 129,2; 78,4; 75,4; 63,2; 58,4; 54,7. HRMS (ESI): $C_7H_{11}O_3S^+$ $[M+H]^+$ -ra számított: 175,0429; mért: 175,0431.

Az optimalizálás során elvégzett kísérletek bemérési adatai és eredményei:

	DVS	Oldószer	Bázis / oldószer	Hőm.	Idő	Kitermelés
1.	310 μ l 1,5 ekv.	THF	58 mg t BuOK / 20 ml (0,25 ekv.)	rt.	45 perc	<10% a 15 szennyezőjeként
2.	820 μ l (4,0 ekv.)	THF	58 mg t BuOK / 20 ml (0,25 ekv.)	rt.	45 perc	156 mg (44%)
3.	820 μ l (4,0 ekv.)	THF	58 mg t BuOK / 20 ml (0,25 ekv.)	0 °C	90 perc	158 mg (45%)
4.	820 μ l (4,0 ekv.)	DMF	58 mg t BuOK / 20 ml (0,25 ekv.)	rt.	45 perc	nem izoláltuk
5.	820 μ l (4,0 ekv.)	THF	50 mg NaH / 25 ml (1,0 ekv.)	rt.	45 perc	-
6.	820 μ l (4,0 ekv.)	THF	115 mg t BuOK / 25 ml (0,50 ekv.)	rt.	30 perc	96 mg (27%)
7.	820 μ l (4,0 ekv.)	THF	46 mg t BuOK / 20 ml (0,20 ekv.)	rt.	45 perc	174 mg (49%)
8.	820 μl (4,0 ekv.)	THF	11 mg tBuOK / 5 ml (0,05 ekv.)	rt.	90 perc	223 mg (63%)
9.	820 μ l (4,0 ekv.)	THF	5 mg t BuOK / 5 ml (0,02 ekv.)	rt.	90 perc	53 mg (15%)

12. táblázat. Az **1** szintézisekor alkalmazott részletes reakciókörülmények.

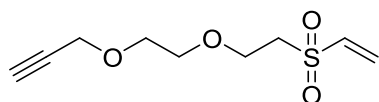


2-(prop-2-iniloxi)etanol (18)

Egy nitrogénnel átöblített lombikba 2,5 ml (22,5 mmol, 1 ekv.) propargil-bromidot (**16**) 80%-os toluolos oldatához 2,5 ml (45,0 mmol, 2 ekv.) etilén-glikolt (**17**) adtunk, majd jeges hűtés és kevertetés mellett 1,08 g (45,0 mmol, 2 ekv.) porított NaOH-ot adtunk hozzá. A reakcióelegyet 45 °C-on 3 órán át kevertettük majd a narancssárga oldatot hagytuk szobahőmérsékletre hűlni. A kivált csapadékot leszűrtük, 2 × 3 ml DCM-nal mostuk és a szűrletet 3 × 10 ml DCM-nal extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokról az oldószert bepároltuk és a nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítva (SiO₂, Hex/EtOAc = 2/1 V/V) termékként 1,34 g (60%) halványsárga olajat kaptunk.

A kísérletet 11,1 ml 80%-os propargil-alkohol oldattal, 22,2 ml (4 ekv.) etilén-glikolal és 6,00 g (1,5 ekv.) NaOH-dal megismételve 8,02 g (80%) terméket tudtunk izolálni.

R_f = 0,25 (Hex/EtOAc = 2/1 V/V). IR: ν(neat) = 3400, 3287, 2935, 2868, 2115, 1729, 1246, 1106 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 4,12 (2H, d, J = 2,2 Hz); 3,66 (2H, t, J = 4,4 Hz); 3,55 (2H, t, J = 4,4 Hz); 2,99 (1H, s); 2,42 (1H, t, J = 2,2 Hz). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 79,3; 74,6; 71,0; 61,2; 58,1. HRMS (ESI): C₅H₉O₂⁺ [M+H]⁺-ra számított: 101,0603; mért: 101,0602.

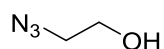


3-{2-[2-(vinilszulfonil)etoxi]etoxi}prop-1-in (2)

N₂-nel átöblített lombikban feloldottunk 320 mg (3,2 mmol, 1 ekv) 2-(prop-2-iniloxi)etanolt (**18**) és 480 μl (4,8 mmol, 1,5 ekv.) divinil-szulfont (**14**) 5 ml vízmentes THF-ban, amihez szobahőmérsékleten, kevertetés közben cseppenként 72 mg (0,71 mmol, 0,22 ekv.) ^tBuOK 30 ml abs. THF-nal készített szuszpenzióját adagoltuk. 45 perc elteltével, mikor a VRK-s követés (Hex/EtOAc = 5/3 V/V) az alkohol teljes átalakulást jelezte, az oldószer eltávolítása után visszamaradt barnássárga anyagot 5 × 10 ml etil-acetáttal extraháltuk, majd a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO₂, Hex/EtOAc = 2/1 V/V). Termékként 402 mg (58 %) halványsárga olajat kaptunk.

R_f = 0,27 (Hex/EtOAc = 5/3 V/V). IR: ν(neat) = 3266, 2872, 2115, 1461, 1385, 1353, 1122 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 6,78 (1H, dd, J = 16,6 Hz, 9,9 Hz); 6,36 (1H, d, J = 16,6 Hz); 6,06 (1H, d, J = 9,9 Hz); 4,16 (2H, d, J = 2,4 Hz); 3,87 (2H, t, J = 5,7 Hz); 3,64 (4H, m); 3,24 (2H, t, J = 5,7 Hz); 2,43 (1H, d, J = 2,4 Hz). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 137,8; 128,7;

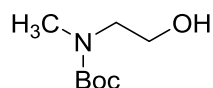
79,3; 74,7; 70,2; 68,6; 64,6; 58,2; 54,9. HRMS (ESI): $C_9H_{15}O_4S^+$ $[M+H]^+$ -ra számított: 219,0691; mért: 219,0689.



2-azidoetanol (20)

2,1 ml (30,0 mmol, 1 ekv.) 2-brómetanolt (**19**) feloldottunk 10 ml vízben és hozzáadtunk 3,91 g (60,0 mmol, 2 ekv.) NaN_3 -ot. A reakcióelegyet 12 órán keresztül 70 °C-on kevertettük, mikorra VRK szerint (Hex/EtOAc = 2/1) az összes kiindulási alkohol elfogyott. A reakcióelegyet hagytuk szobahőmérsékletre hűlni, majd 3×15 ml Et_2O -rel extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokat $MgSO_4$ -on való szárítás után szűrtük és az oldószer óvatos bepárlása után termékként 2,65 g színtelen folyadékot kaptunk, ami NMR alapján ~80 m/m%-os éteres oldat volt. Így a termék 2,12 g (81%).

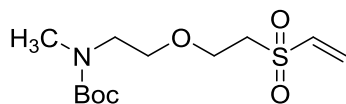
$R_f = 0,50$ (Hex/EtOAc = 1/1 V/V). IR: $\nu(\text{neat}) = 3384, 2935, 2880, 2095, 2103 \text{ cm}^{-1}$. 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 3,75$ (1H, t, $J = 5,2 \text{ Hz}$); 3,42 (1H, t, $J = 5,2 \text{ Hz}$); 2,61 (1H, s). ^{13}C -NMR (62,5 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 61,5; 53,6$. HRMS (ESI): $C_2H_6N_3O^+$ $[M+H]^+$ -ra számított: 88,0505; mért: 88,0503.



tert-butyl (2-hidroxietyl)(metil)karbamát (23)

Egy N_2 -nel átöblített lombikban feloldottunk 1,60 ml (19,9 mmol, 1 ekv.) 2-(metilamino)-etanolt (**22**) 70 ml vízmentes DCM-ban, majd jeges hűtés közben hozzácsepegtettük 4,35 g (19,9 mmol, 1 ekv.) Boc_2O 30 ml abs. DCM-mel készült oldatát. Ezt követően a reakcióelegyet 14 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük, majd 35 ml telített NH_4Cl oldatot adtunk hozzá és a vizes fázis elválasztása után azt 2×100 ml DCM-nal extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokat $MgSO_4$ felett szárítottuk, szűrtük és bepároltuk. A nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítva (Hex/EtOAc = 1/1 V/V) 2,38 g (68%) színtelen olajhoz jutottunk.

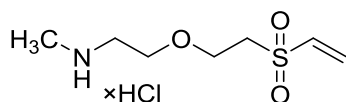
$R_f = 0,28$ (Hex/EtOAc = 2/1 V/V). IR: $\nu(\text{neat}) = 3426, 2975, 2932, 1667, 1392, 1148 \text{ cm}^{-1}$. 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 3,64$ (2H, t, $J = 5,6 \text{ Hz}$); 3,29 (3H, m); 2,84 (3H, s); 1,38 (9H, s). ^{13}C -NMR (62,5 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 156,7; 80,1; 61,3; 51,6; 35,8; 28,7$. HRMS (ESI): $C_8H_{17}NNaO_3^+$ $[M+Na]^+$ -ra számított: 198,1101; mért: 198,1097.



tert-butyl metil{2-[2-(vinilszulfonil)etoxi]etil}karbamát (24)

N₂-nel átöblített lombikban feloldottunk 500 mg (2,85 mmol, 1 ekv) **23**-at és 860 µl (8,55 mmol, 3 ekv.) DVS-t (**14**) 100 ml vízmentes THF-ban, amihez szobahőmérsékleten, kevertetés közben hozzácepegettük 52 mg (0,43 mmol, 0,15 ekv.) ^tBuOK 10 ml abs. THF-nal készített szuszpenzióját. 45 perc elteltével, mikor a VRK-s követés (Hex/EtOAc = 1/1 V/V) az alkohol teljes átalakulást jelezte, az oldószer eltávolítása után visszamaradt anyagot 5 × 15 ml etil-acetáttal extraháltuk, majd a nyersterméket celitre koncentráltuk és oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO₂, Hex/EtOAc = 1/1 → 1/2 V/V). Termékként 432 mg (52 %) szintelen olajat kaptunk.

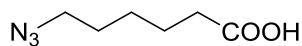
R_f = 0,35 (Hex/EtOAc = 1/1 V/V). IR: ν(neat) = 2973, 2930, 2490, 1686, 1313, 1156, 1117 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 6,70 (1H, dd, J = 16,6 Hz, 9,8 Hz); 6,40 (1H, d, J = 16,6 Hz); 6,10 (1H, d, J = 9,8 Hz); 3,86 (2H, t, J = 5,6 Hz); 3,57 (2H, t, J = 5,4 Hz); 3,39 (2H, m); 3,24 (2H, t, J = 5,6 Hz); 2,89 (3H, s); 1,46 (9H, s). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 138,1; 129,2; 100,4; 80,0; 69,7; 64,9; 55,4; 52,1; 35,7; 28,8. HRMS (ESI): C₁₂H₂₃NNaO₅S⁺ [M+Na]⁺-ra számított: 316,1189; mért: 316,1180.



N-metil-2-(2-(vinilszulfonil)etoxi)etán-1-amin hidroklorid só (25)

20 ml vízmentes metanolt N₂ áram alatt lehűtöttünk 0 °C-ra, majd lassan 2,4 ml acetyl-kloridot csepegtettünk bele, ezzel ~5 M HCl-os metanol oldatot kapva. Ehhez hűtés közben 570 mg (1,94 mmol) Boc-védett **24** amin 5 ml abs. MeOH-lal készült oldatát adtuk, majd 4 órán át kevertettük a reakcióelegyet és hagytuk szobahőmérsékletűre melegedni. A reakcióidő letelte után rotációs vákuumbepárlón eltávolítottuk az illékony anyagokat, így 436 mg (98%) sárga, olajos terméket kapva, ami további tisztítást nem igényelt.

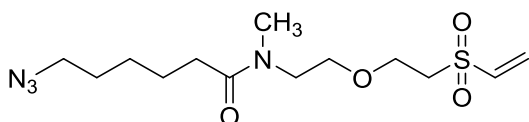
IR: ν(neat) = 2924, 2490, 1673, 1295, 1175, 1116 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 9,03 (2H, brs); 6,72 (1H, dd, J = 16,6 Hz, 9,9 Hz); 6,37 (1H, d, J = 16,6 Hz); 6,14 (1H, d, J = 9,9 Hz); 3,90-3,70 (4H, m); 3,19 (2H, m); 2,98 (2H, m); 2,71 (3H, s). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 136,7; 130,2; 65,5; 63,9; 53,7; 48,4; 33,2. HRMS (ESI): C₇H₁₆NO₃S⁺ [M+H]⁺-ra számított: 194,0845; mért: 194,0849.



6-azidohexánsav (27)

1,95 g (10,0 mmol, 1 ekv.) 6-brómhexánsavat és 1,95 g (30,0 mmol, 3 ekv.) NaN₃-ot 10 ml DMF-ban szuszpendáltunk és 18 órán keresztül 80 °C-on kevertettük a reakcióelegyet. A reakcióidő után hagytuk szobahőmérsékletűre hűlni, majd 100 ml EtOAc-ot adtunk hozzá. A szerves fázist elválasztottuk és 2 × 80 mL 1 M HCl-oldattal, 2 × 80 mL vízzel, végül 1 × 100 ml telített NaCl-oldattal mostuk és MgSO₄-on szárítottuk. Szűrés és az oldószer eltávolítása után a terméként 1,48 g (94%) színtelen olajat kaptunk, ami további tisztítást nem igényelt.

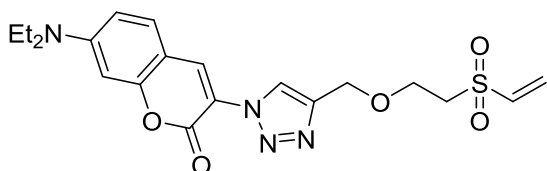
R_f = 0,45 (Hex/EtOAc = 1/1 V/V). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 11,73 (1H, brs); 3,25 (2H, t, J = 6,8 Hz); 2,35 (2H, t, J = 7,4 Hz); 1,70-1,54 (4H, m); 1,47-1,34 (2H, m). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 180,0; 51,2; 33,9; 28,5; 26,2; 24,2. HRMS (ESI): C₆H₁₂N₃O₂⁺ [M+H]⁺-ra számított: 158,0924; mért: 158,0926.



6-azido-N-metil-N-{2-[2-(vinilszulfonil)etoxi]etil}hexánamid (3)

Feloldottunk 62 mg (0,39 mmol, 1 ekv.) 6-azidohexánsavat (27) és 83 mg (0,43 mmol, 1,1 ekv.) EDAC×HCl-t 10 ml DCM-ban, majd 180 µl (1,29 mmol, 3,3 ekv.) TEA-t adtunk hozzá és 20 percig szobahőmérsékleten kevertettük. Az aktiválási idő letelte után 108 mg (0,47 mmol, 1,2 ekv.) **25** 3 ml DCM-nal készült oldatát csepegtettük hozzá és további 1,5 órán át szobahőmérsékleten kevertettük a reakcióelegyet, mikorra VRK-s követés (EtOAc) alapján az összes kiindulási anyag átalakult. A nyersterméket szilikagélre koncentráltuk és oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO₂, EtOAc). A termék 45 mg (35%) piszkosfehér, ragacsos anyag.

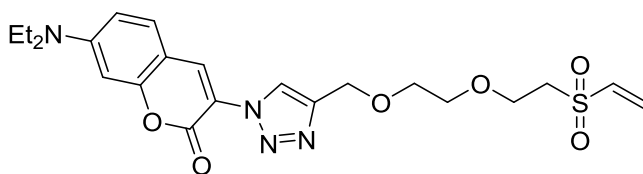
R_f = 0,56 (EtOAc). IR: ν(neat) = 2932, 2866, 2095, 1638, 1315, 1295, 1118 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 6,73 (1H, dd, J = 16,6 Hz, 9,8 Hz); 6,41 (1H, d, J = 16,6 Hz); 6,11 (1H, d, J = 9,8 Hz); 3,86 (2H, t, J = 5,6 Hz); 3,56 (5H, m); 3,26 (4H, m); 3,05 (2H, s); 2,35 (2H, m); 1,66 (6H, m). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 173,4; 138,0; 129,5; 69,6; 64,7; 55,2; 51,7; 47,8; 37,1; 33,7; 29,1; 26,9; 24,8. HRMS (ESI): C₁₃H₂₅N₄O₄S⁺ [M+H]⁺-ra számított: 333,1591; mért: 333,1588.



7-(dietilamino)-3-{4-[(2-{vinilszulfonil}etoxi)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}-kumarin (4)

10 ml acetonitrilben feloldottunk 67 mg (0,39 mmol, 1 ekv.) 3-(2-(vinilszulfonil)etoxi)prop-1-int (1) és 100 mg (0,39 mmol, 1 ekv.) 3-azido-7-dietilaminokumarint (30), majd 80 µl TEA-t (0,58 mmol, 1,5 ekv) és 7,4 mg (0,039 mmol, 0,1 ekv.) CuI katalizátort adtunk hozzá és szobahőmérsékleten 1 órán át kevertettük a reakcióelegyet, mikorra VRK alapján (Hex/EtOAc = 1/1 V/V) az összes kiindulási anyag elfogyott. Az oldószer eltávolítása után kapott ragacsos anyagot 3 × 5 ml EtOAc-tal extraháltuk és a nyersterméket szilikagélre koncentráltuk. Oszlopkromatográfiás tisztítás (SiO₂, Hex/EtOAc = 1/1 → 1/3 V/V) után 62 mg (37%) sárga port kaptunk termékként.

R_f = 0,14 (Hex/EtOAc = 1/1 V/V). Op = 152-154 °C. IR: ν(neat) = 3179, 3069, 2925, 2875, 1708, 1621, 1596, 1526, 1484, 1465, 1432, 1291, 1249 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8,50 (1H, s); 8,39 (1H, s); 7,41 (1H, d, J = 8,9 Hz); 6,76 (1H, dd, J = 16,6 Hz, 9,9 Hz); 6,68 (1H, dd, J = 8,9 Hz, 2,4 Hz); 6,55 (1H, d, J = 2,4 Hz); 6,40 (1H, d, J = 16,6 Hz); 6,10 (1H, d, J = 9,9 Hz); 4,72 (2H, s); 3,97 (2H, t, J = 5,6 Hz); 3,46 (4H, q, J = 7,1 Hz); 3,28 (2H, t, J = 5,6 Hz); 1,24 (6H, t, J = 7,1 Hz). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 156,9; 155,8; 151,7; 143,7; 137,7; 134,8; 130,0; 129,1; 123,7; 116,6; 110,1; 107,0; 97,0; 64,4; 63,9; 55,0; 45,0; 12,4. HRMS (ESI): C₂₀H₂₅N₄O₅S⁺ [M+H]⁺-ra számított: 433,1546; mért: 433,1544.

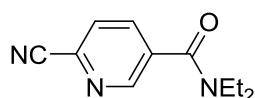


7-(dietilamino)-3-{4-[(2-{2-{vinilszulfonil}etoxi}etoxi)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il}-kumarin (5)

130 mg (0,50 mmol, 1 ekv) 3-azido-7-dietilaminokumarint (30) és 109 mg (0,50 mmol, 1 ekv.) 3-(2-(2-(vinilszulfonil)etoxi)etoxi)prop-1-int (2) feloldottunk 20 ml MeCN-ben, majd 100 µl TEA-t (0,70 mmol, 1,4 ekv) és 95 mg (0,50 mmol, 1 ekv.) CuI-ot adtunk hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 1 órán át kevertettük, mikorra VRK alapján (Hex/EtOAc = 1/2 V/V) az összes vinil-szulfon kiindulási anyag elfogyott. A reakcióelegyet közvetlenül szilikagélre koncentráltuk és a nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk (SiO₂,

Hex/EtOAc = 1/1 → 1/3 V/V). A termék 151 mg (64%) narancssárga-sárgásbarna szilárd anyag.

$R_f = 0,12$ (Hex/EtOAc = 1/2 V/V). $Op = 101-103\text{ }^\circ\text{C}$. IR: $\nu(\text{neat}) = 3160, 3060, 2976, 2904, 2870, 1714, 1695, 1624, 1596, 1472, 1381, 1346, 1291, 1265, 1243, 1188\text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,53$ (1H, s); $8,35$ (1H, s); $7,39$ (1H, d, $J = 8,9\text{ Hz}$); $6,79$ (1H, dd, $J = 16,6\text{ Hz}, 9,9\text{ Hz}$); $6,66$ (1H, d, $J = 8,9\text{ Hz}$); $6,53$ (1H, s); $6,36$ (1H, d, $J = 16,6\text{ Hz}$); $6,07$ (1H, d, $J = 9,9\text{ Hz}$); $4,72$ (2H, s); $3,88$ (2H, t, $J = 5,6\text{ Hz}$); $3,67$ (4H, m); $3,44$ (4H, q, $J = 7,0\text{ Hz}$); $3,25$ (2H, t, $J = 5,6\text{ Hz}$); $1,22$ (6H, t, $J = 7,0\text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3): $\delta = 156,9; 155,7; 151,5; 144,4; 137,8; 134,8; 130,0; 128,8; 123,6; 116,7; 110,0; 106,9; 96,9; 70,4; 69,2; 64,6; 64,3; 54,9; 44,9; 12,3$. HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ -ra számított: 477,1808; mért: 477,1810.

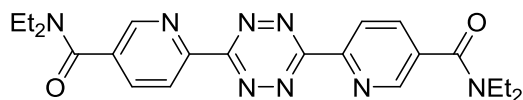


6-ciano-*N,N*-diethylnikotinamid (35)

240 mg (1,6 mmol, 1 ekv.) 6-cianonikotinsavat (**34**) feloldottunk 15 ml THF-ban, majd 599 mg (1,5 mmol 0,95 ekv.) HBTU, 257 mg HOBt (1,6 mmol, 1 ekv.), 604 μl (3,5 mmol, 2,2 ekv.) EDIPA és 210 μl dietilamin (2,0 mmol, 1,25 ekv.) hozzáadása után a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 12 órán át. Az illékony komponenseket rotációs vákuumbepárlón távolítottuk el és a visszamaradt nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítva (SiO_2 , Hex/EtOAc = 3/1 V/V) termékként 283 mg (87%) halványsárga olajat kaptunk. A szintézist 500 mg (3,4 mmol, 1 ekv.) **34** felhasználásával, 525 μl (5,0 mmol, 1,5 ekv.) dietilamin alkalmazásával megismételve 635 mg (92%) termelést sikerült elérni.

A kapott termék adatai megegyeznek az irodalomban találhatókval.¹⁰³

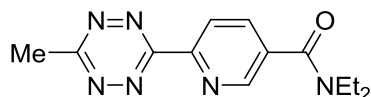
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,66$ (1H, d, $J = 1,2\text{ Hz}$); $7,80$ (1H, dd, $J = 7,9\text{ Hz}, 2,1\text{ Hz}$); $7,70$ (1H, dd, $J = 7,9\text{ Hz}, 0,7\text{ Hz}$); $3,57-3,09$ (4H, m); $1,20$ (6H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3): $\delta = 171,8; 147,2; 138,2; 131,8; 131,3; 123,2; 116,2; 41,9; 13,15$.



6,6'-(1,2,4,5-tetrazin-3,6-diil)bis(*N,N*-dietilnikotinamid) (6)

290 mg (1,4 mmol, 1 ekv.) **35** nikotinamidot 10 ml THF-nal készült oldatához kevertetés közben hozzácepegettünk 141 μ l (2,93 mmol, 2,1 ekv.) hidrazin-monohidrátot (64%) és 80 °C-on kevertettük 16 órán keresztül. Az oldószer elpárologtatása után a kapott dihidrotetrazint 150 ml DCM-ban oldottuk és nitrózus gázok ($\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$) átbuborékolatásával oxidáltuk 15 percen keresztül. Az oldószer elpárologtatása után a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítva (SiO_2 , MeOH/DCM = 6/94 V/V) közel tiszta tetrazint kaptunk, ami etil-acetátból átkristályosítva 92 mg (30%) piros szilárd anyagot eredményezett termékként.

$R_f = 0,70$ (MeOH/DCM = 6/94 V/V). Op = 180-183 °C (bomlik). IR: $\nu(\text{neat}) = 1629, 1427, 1362, 1290, 1124, 857, 603 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,98$ (2H, d, $J = 1,4 \text{ Hz}$); 8,81 (2H, d, $J = 8,2 \text{ Hz}$); 8,04 (2H, dd, $J = 8,2 \text{ Hz}, 1,4 \text{ Hz}$); 3,61 (4H, q, $J = 6,3 \text{ Hz}$); 3,33 (4H, q, $J = 6,3 \text{ Hz}$); 1,40-1,10 (12H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 167,7; 163,6; 150,4; 148,6; 136,0; 135,8; 124,5; 43,6; 39,9; 14,5; 13,0$. $^{13}\text{C-DEPT-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 167,7(-); 163,6(-); 150,4(-); 148,6(+); 136,0(+); 135,8(-); 124,5(+); 43,6(-); 39,9(-); 14,5(+); 13,0(+)$. HRMS (ESI): $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{NaO}_2^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$ -ra számított: 457,2076; mért: 457,2029.

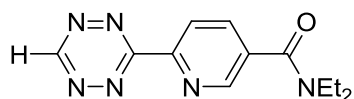


N,N-dietil-6-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)nikotinamid (7)

420 mg (2,0 mmol, 1 ekv.) **35** nikotinamidot 20 ml MeCN-ben oldottunk és hozzáadagoltunk 511 μ l (10,25 mmol, 5,12 ekv.) hidrazin-monohidrátot (64%), majd 16 órán keresztül 90 °C-on kevertettük a reakcióelegyet. Az oldószer elpárologtatása után a kapott dihidrotetrazint 80 ml DCM-ban oldottuk, 2 \times 20 ml 5%-os citromsav-oldattal és 1 \times 20 ml telített Na_2CO_3 -oldattal mostuk, majd MgSO_4 -on szárítottuk és szűrtük. A dihidrotetrazint nitrózus gázok ($\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$) átbuborékolatásával oxidáltuk 15 percen keresztül. Az oldószer elpárologtatása után a nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítva (SiO_2 , MeOH/DCM = 1/30 V/V) 55 mg (10%) rózsaszín szilárd anyagot kaptunk, amit etanolból átkristályosítva 49 mg (9%) rózsaszín port eredményezett.

$R_f = 0,31$ (MeOH/DCM = 1/30 V/V). Op = 177-179 °C (bomlik). IR: $\nu(\text{neat}) = 2979, 2967, 1617, 1403, 1363, 1285, 867 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,85$ (1H, s); 8,75 (1H, d,

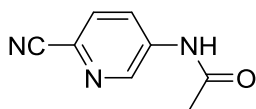
J = 7,8 Hz); 8,16 (1H, d, J = 7,8 Hz); 3,62 (2H, q, J = 6,4 Hz); 3,38 (2H, q, J = 6,4 Hz); 3,13 (3H, s); 1,30 (3H, t, J = 6,4 Hz); 1,20 (3H, t, J = 6,4 Hz). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 169,9; 169,8; 164,1; 152,1; 148,8; 137,3; 136,7; 124,9; 45,1; 41,2; 21,3; 14,4; 13,1. ¹³C-DEPT-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 169,9(-); 169,8(-); 164,1(-); 152,1(-); 148,8(+); 137,3(+); 136,7(-); 124,9(+); 45,1(-); 41,2(-); 21,3(+); 14,4(+); 13,1(+). HRMS (ESI): C₁₃H₁₆N₆NaO⁺ [M+Na]⁺-ra számított: 295,1283; mért: 295,1295.



N,N-diethyl-6-(1,2,4,5-tetrazin-3-il)nikotinamid (8)

2,95 g (28,3 mmol, 12 ekv.) formamidin-acetátot feloldottunk 10,0 ml hidrazin-monohidráiban (64%) és felmelegítettük 60 °C-fokra, amikor 480 mg (2,36 mmol, 1 ekv.) **35** nikotinamid 20 ml vízmentes etanollal készült oldatát csepegtettük hozzá 15 perc alatt, majd a reakcióelegyet 80 °C-on kevertettük 16 órán át. Az oldószer eltávolítása után visszamaradt ragacsos anyagot 200 ml EtOAc-ban oldottuk és 2 × 50 ml 10%-os citromsav-oldattal, 2 × 40 ml telített NaHCO₃-oldattal és 1 × 30 ml telített NaCl-oldattal mostuk, majd MgSO₄-on szárítottuk és szűrtük. Az oldószer elpárologtatása után a dihidrotetrazint 150 ml DCM-ben oldottuk és 950 µl (7,08 mmol, 3 ekv.) izpentil-nitrit hozzáadása után szobahőmérsékleten 3 órán át kevertettük, mikorra a kezdetben sárga reakcióelegy pirosra színeződött és VRK alapján az összes kiindulási anyag átalakult (MeOH/DCM = 6/94 V/V). Az oldószer bepárlása után a nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk (SiO₂, MeOH/DCM = 1/50 → 1/30 V/V) és termékként 256 mg (42%) lilás-pirosas szilárd anyagot kaptunk, ami további tisztítást nem igényelt.

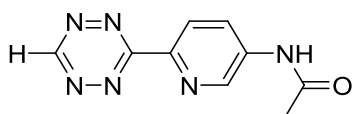
R_f = 0,40 (MeOH/DCM = 6/94 V/V). Op = 222-225 °C (bomlik). IR: ν(neat) = 3074, 2936, 1618, 1429, 1344, 1096, 866 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 10,35 (1H, s); 8,91 (1H, d, J = 1,8 Hz); 8,70 (1H, d, J = 8,1 Hz); 7,99 (1H, dd, J = 8,1 Hz, 1,8 Hz); 3,56 (2H, q, J = 6,5 Hz); 3,27 (2H, q, J = 6,5 Hz); 1,25 (3H, t, J = 6,5 Hz); 1,14 (3H, t, J = 6,5 Hz). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 167,4; 165,2; 158,3; 150,1 148,2; 135,8; 135,6; 123,9; 43,4; 39,6; 14,2; 12,7. HRMS (ESI): C₁₂H₁₅N₆O⁺ [M+H]⁺-ra számított: 259,1302; mért: *nem kaptunk eredményt, valószínűleg elbomlott a detektorba érkezés előtt.*



***N*-(6-cianopiridin-3-il)acetamid (37)**

2,38 g (20,0 mmol, 1 ekv.) 5-amino-2-cianopiridint (**36**) és 7,0 ml trietilamint (50,0 mmol 2,5 ekv.) feloldottunk 140 ml vízmentes DCM-ban. A reakcióelegyhez jeges-vizes hűtés közben hozzácepegettünk 2,90 ml (40 mmol, 2 ekv.) acetil-kloridot, majd hagytuk szobőmérsékletre melegedni és további 18 órán át kevertettük. Az oldatot 1 × 60 ml vízzel és 1 × 60 ml telített NaCl-oldattal mostuk és MgSO₄ fölött szárítottuk. Szűrés és az oldószer eltávolítása után a nyersterméket minimális mennyiségű Hex/DCM = 2/1 V/V elegyből kristályosítottuk át, 2,13 g (66%) piszkosfehér porhoz jutva.

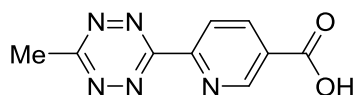
R_f = 0,25 (Hex/EtOAc = 1/3 V/V). Op = 175-177 °C (bomlik). IR: ν(neat) = 3250, 3096, 2234, 1528, 1366, 1234, 851 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 10,62 (1H, s); 8,81 (1H, d, J = 2,4 Hz); 8,24 (1H, dd, J = 8,6 Hz, 2,4 Hz); 7,95 (1H, d, J = 8,6 Hz); 2,12 (3H, s). ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 169,7; 141,7; 139,1; 129,7; 125,7; 125,5; 117,7; 24,1. HRMS (ESI): C₈H₈N₃O⁺ [M+H]⁺-ra számított: 162,0662; mért: 162,0664.



***N*-(6-(1,2,4,5-tetrazin-3-il)piridin-3-il)acetamid (9)**

9,37 g (90,0 mmol, 10 ekv.) formamidin-acetátot és 290 mg (9,0 mmol, 1 ekv.) ként feloldottunk 14,0 ml hidrazin-monohidrátnak (64%), majd 1,45 g (9,0 mmol, 1 ekv.) *N*-(6-cianopiridin-3-il)acetamidot (**37**) adtunk hozzá és a reakcióelegyet 60 °C-on kevertettük 16 órán keresztül. Miután hagytuk szobahőmérsékletre hűlni, 200 ml EtOAc-ot adtunk hozzá és 3 × 80 ml 10%-os citromsav-oldattal, 2 × 50 ml telített NaHCO₃-oldattal és 1 × 30 ml telített NaCl-oldattal mostuk, majd MgSO₄-on szárítottuk és szűrtük. Az oldószer elpárologtatása után a nyers dihidrotetrazint oszlopkromatográfiával tisztítottuk (SiO₂, MeOH/DCM = 1/30 → 1/9 V/V) és így 272 mg (1,2 mmol 14%) barnássárga szilárd köztiterméket kaptunk. Ezt 50 ml DCM-ben oldottuk és 480 μl (3,6 mmol, 3 ekv.) izpentil-nitrit hozzáadása után szobahőmérsékleten 3 órán át kevertettük, mikorra a kezdetben sárga reakcióelegy lila színű lett és VRK alapján az összes kiindulási anyag átalakult (MeOH/DCM = 6/94 V/V). Az oldószer rotációs vákuumbepárlón való eltávolításával 261 mg (13%) lila port kaptunk termékként, ami további tisztítást nem igényelt.

$R_f = 0,33$ (MeOH/DCM = 6/94 V/V). $Op = 177-180\text{ }^\circ\text{C}$ (bomlik). IR: $\nu(\text{neat}) = 3261, 3091, 2922, 1688, 1531, 1357, 1238\text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 10,63$ (1H, s); $10,59$ (1H, s); $8,99$ (1H, d, $J = 2,1\text{ Hz}$); $8,55$ (1H, d, $J = 8,7\text{ Hz}$); $8,39$ (1H, dd, $J = 8,7\text{ Hz}, 2,1\text{ Hz}$); $2,15$ (3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,6; 164,8; 158,1; 143,9; 141,1; 138,5; 126,0; 124,8; 24,1$. HRMS (ESI): $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_6\text{O}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ -ra számított: 217,0832; mért: *nem kaptunk eredményt, valószínűleg elbomlott a detektorba érkezés előtt.*

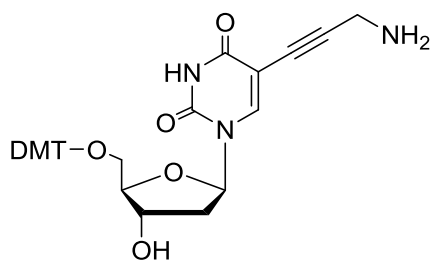


6-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)nikotinsav (39)

Egy N_2 -nel átöblített lombikban 593 mg (4,0 mmol, 1 ekv.) 6-cianonikotinsavhoz (34), 90 mg (2,8 mmol, 0,7 ekv.) kénhez és 18,3 ml (100 mmol, 25 ekv.) trietil-ortoacetáthoz 15,0 ml (300 mmol, 75 ekv.) hidrazin-monohidrátot (64%) adtunk és a kétfázisú reakcióelegyet erős kevertetés mellett két órán át $100\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottuk, majd hagytuk szobahőmérsékletűre hűlni. 200 ml EtOAc hozzáadásával hígítottuk és $3 \times 75\text{ ml}$ 10%-os citromsav-oldattal, $2 \times 50\text{ ml}$ telített NaHCO_3 -oldattal és $1 \times 30\text{ ml}$ telített NaCl -oldattal mostuk, majd MgSO_4 -on szárítottuk és szűrtük. A nyers köztterméket 150 ml DCM-ben szuszpendáltuk és nitrózus gázok ($\text{NaNO}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$) átbuborékolatásával oxidáltuk 3 órán keresztül (15 perc buborékolatás, 15 perc szünet ismétlődve), mikorra VRK követés alapján (MeOH/DCM = 1/10 V/V) az összes dihidrotetrazin átalakult és reakcióelegy mélyvörös színűvé változott. Az oldószer eltávolítása után oszlopkromatográfiás tisztítással (SiO_2 , MeOH/DCM = 1/9 V/V) 218 mg (25%) lilásvörös szilárd anyagot kaptunk termékként.

$R_f = 0,21$ (MeOH/DCM = 1/10 V/V). $Op = 158-161\text{ }^\circ\text{C}$ (bomlik). IR: $\nu(\text{neat}) = 3051, 2850, 2552, 1680, 1402, 1247, 1020\text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9,33$ (1H, dd, $J = 2,1\text{ Hz}, 0,7\text{ Hz}$); $8,64$ (1H, dd, $J = 8,2\text{ Hz}, 0,7\text{ Hz}$); $8,56$ (1H, dd, $J = 8,2\text{ Hz}, 2,1\text{ Hz}$); $3,06$ (3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 167,7; 165,9; 162,7; 153,2; 150,8; 138,5; 128,6; 123,7; 21,0$.

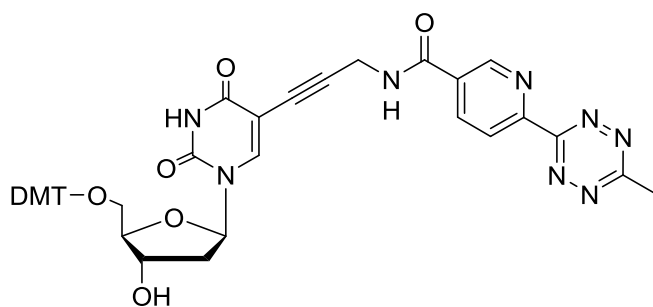
MS (ESI): $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_5\text{O}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ -ra számított: 216,1; mért: 216,0. HRMS (ESI): $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_5\text{NaO}_2^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -ra számított: 240,0492; mért: 240,0484.



5-(3-aminoprop-1-in-1-il)-1-{{[2*R*,4*S*,5*R*]-5-[(bis{4-metoxifenil}{fenil}metoxi)metil]-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il}pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (47)

Egy N₂-nel, alufóliával betakart lombikban 657 mg (1,0 mmol, 1 ekv.) 5-jód-2'-dezoxi-5'-DMT-uridint (**45**) és 42 mg (0,2 mmol, 0,2 ekv.) CuI-ot 6 ml abs. DMF-ben szuszpendáltunk és szobahőmérsékleten 30 percen át kevertettük, majd 420 µl (3,0 mmol, 3 ekv.) TEA-t, 455 mg (3,0 mmol, 3 ekv.) *N*-propinil-trifluoracetamidot (**46**) és végül 116 mg (0,1 mmol, 0,1 ekv.) Pd(PPh₃)₄ katalizátort adtunk hozzá, majd 48 óráig 40 °C-on kevertettük a reakcióelegyet, mialatt a kezdetben sárga oldat narancs-barna színű lett. Az oldószer rotációs vákuumbepárlón való eltávolítása után a visszamaradt anyagot 15 ml száraz THF-ban feloldottuk, 700 mg elporított K₂CO₃-ot adtunk hozzá és 2 órán keresztül kevertettük. Az oldhatatlan sók kiszűrése után a szűrletről eltávolítottuk az oldószert és a visszamaradt anyagot 5 ml abs. MeOH-ban szuszpendáltuk. A kiváló csapadékot megint eltávolítva és a szűrletet bepárolva, majd a metanolos mosást még kétszer megismételve szárítás után ~550 mg ragacsos anyagot kaptunk, amit 10 ml MeOH-ban oldottuk fel, majd 30 ml 25%-os vizes ammónia-oldatot adtunk hozzá és 4 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük. Az oldószer eltávolítása után mg 426 mg (73%) sárga olajhoz jutottunk, amit a következő lépésben további tisztítás nélkül használtunk fel.

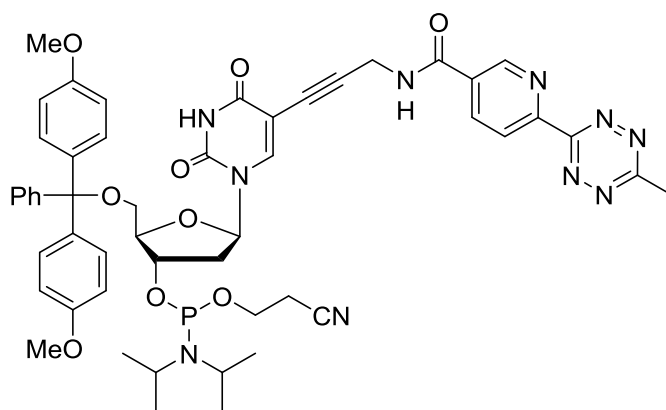
HRMS (ESI): C₃₃H₃₄N₃O₇⁺ [M+H]⁺-ra számított: 584,2391; mért: 584,2384.



***N*-{3-[1-({2*R*,4*S*,5*R*}-5-[[bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi]metil]-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il]prop-2-in-1-il}-6-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)nikotinamid (48)**

56 mg (0,26 mmol, 1 ekv.) **39** tetrazint, 107 mg (0,28 mmol, 1,1 ekv.) HBTU-t és 3,9 mg (0,03 mmol, 0,1 ekv.) HOBT-t 16 órán keresztül vákuumban szárítottunk, majd 5 ml száraz DMF-ben oldottunk fel és 15 percig szobahőmérsékleten kevertettünk. Ezután 60 μ L (0,35 mmol, 1,35 ekv.) EDIPA-t adtunk hozzá és újabb 15 percig kevertettük, majd 150 mg (0,26 mmol, 1 ekv.) **47** amin-funkcionalizált dezoxiuridin 2 ml abs. DMF-dal készült oldatát csepegtettük bele és a kapott reakcióelegyet 16 órán keresztül kevertettük. Az oldószer bepárlása után a visszamaradó nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk (deaktivált SiO₂, MeOH/DCM = 1/30 V/V + 0,1% EDIPA) és termékként 132 mg (65%) szilárd anyagot kaptunk.

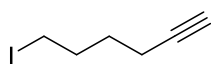
R_f = 0,3 (MeOH/DCM = 1/15 V/V). IR: $\nu(\text{neat})$ = 3051, 2850, 2552, 1680, 1402, 1247, 1020 cm^{-1} . ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11,70 (1H, s); 9,38 (1H, t, *J* = 5,0 Hz); 9,28 (1H, m); 8,61 (1H, d, *J* = 8,2 Hz); 8,49 (1H, d, *J* = 8,2 Hz); 7,94 (1H, s); 7,30 (9H, m); 6,89 (4H, m); 6,10 (1H, t, *J* = 6,3 Hz); 5,34 (1H, d, *J* = 4,4 Hz); 4,27 (1H, m); 4,22 (2H, d, *J* = 5,5 Hz); 3,92 (1H, m); 3,72 (6H, s); 3,25 (2H, m); 3,06 (3H, s); 2,25 (2H, m). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167,8; 163,9; 162,9; 161,7; 158,1; 152,4; 149,4; 149,3; 144,8; 143,5; 136,9; 135,7; 135,2; 131,2; 129,8; 129,7; 128,4; 127,0; 128,6; 123,5; 113,3; 98,3; 89,1; 85,9; 85,1; 74,5; 70,5; 63,8; 55,1; 53,6; 45,8; 41,9; 29,5; 21,1; 18,1; 16,8; 12,6; 8,7. HRMS (ESI): C₄₂H₃₉N₈O₈⁺ [M+H]⁺-ra számított: 783,2884; mért: 783,2885.



(2*R*,3*S*,5*R*)-2-[[bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi]metil]-5-{5-[3-(6-{6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il}nikotinamido)prop-1-in-1-il]-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2*H*)-il]tetrahydrofuran-3-il (2-cianoetil) diizopropilfoszforamidit (50)

Egy N₂-nel átöblített lombikban 80 mg (0,10 mmol, 1 ekv.) **48**-at feloldottunk 2 ml abs. DCM-ban és 37 µl (0,20 mmol, 2 ekv.) EDIPA-t, majd 34 µl (0,15 mmol, 1,5 ekv.) 2-cianoetil-*N,N*-diizopropil-klórfoszforamiditet (**49**) adtunk hozzá és az oldatot 1,5 órán át kevertettük szobahőmérsékleten. A reakcióidő letelte után a reakcióelegyet közvetlenül egy rövid oszlopra vittük fel és a gyors kromatográfiás tisztítás (deaktivált SiO₂, aceton/DCM = 2/3 V/V + 0,1% EDIPA) eredményeképpen kapott ragacsos terméket benzolban oldottuk és liofilizálás (fagyasztva szárítás nagyvákuumban) után 88 mg (89%) rózsaszín port kaptunk.

R_f = 0,8 (aceton/DCM = 2/3 V/V). IR: ν(neat) = 3051, 2850, 2552, 1680, 1402, 1247, 1020 cm⁻¹. ³¹P-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 150,7; 149,7. HRMS (ESI): C₅₁H₅₆N₁₀O₉P⁺ [M+H]⁺-ra számított: 983,3964; mért: 983,3962.

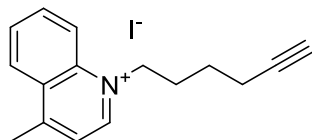


6-jódhex-1-in (53)

1,10 ml (9,0 mmol, 1 ekv.) 6-klórhex-1-int feloldottunk 15 ml acetonban és 6,80 g (45,0 mmol, 5 ekv.) NaI hozzáadása után a reakcióelegyet 80 °C-on kevertettük 24 órán át. Szűrést és az oldószer eltávolítását követően a kapott nyerterméket 30 ml DCM-ban oldottuk, választótölcsérben 20 ml telített Na₂S₂O₃-oldattal reagáltattuk, majd 1 × 20 ml vízzel és 1 × 20 ml telített NaCl-oldattal mostuk. MgSO₄-on való szárítás után az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítva 1,76 g (93%) tiszta, színtelen folyadékot kaptunk.

Méretnöveléskor a szintézisnél 5,0 ml (40,9 mmol) 6-klórhex-1-inből kiindulva, 18 órás reakcióidővel 8,17 g (95%) terméket kaptunk.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 3,22 (2H, t, J = 6,9 Hz); 2,24 (2H, td, J = 6,9 Hz, 2,6 Hz); 1,96 (3H, m); 1,64 (2H, q, J = 7,2 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3): δ = 83,6; 68,9; 32,2; 29,0; 17,4; 6,0.

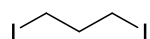


1-(hex-5-in-1-il)-4-metilkinolínium jodid (54)

270 μl (2,0 mmol, 1 ekv.) lepidint (4-metilkinolint, **52**) és 830 mg (4,0 mmol, 2 ekv.) 6-jódhex-1-int (**53**) 6 ml acetonitrilben oldottunk, majd 90 °C-on 21 órán át kevertettük. Az oldószer bepárlása után a nyersterméket etil-acetátban szuszpendáltuk, majd szűrés és bepárlás után minimális mennyiségű etanolból kristályosítottuk át. A termék 509 mg (71%) fakózöld színű szilárd anyag.

Méretnöveléskor 2,00 ml (14,8 mmol) lepidint és 2,5 ekvivalens alkilezőszert felhasználva 4,58 g (86%) termékhez jutottunk.

Op. = 150-153 °C. IR: $\nu(\text{neat})$ = 3199, 2920, 1603, 1586, 1404, 1367 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 9,42 (1H, d, J = 6,0 Hz); 8,61 (1H, d, J = 8,9 Hz); 8,55 (1H, d, J = 8,4 Hz); 8,27 (1H, t, J = 7,9 Hz); 8,06 (2H, m); 5,04 (2H, t, J = 7,3 Hz); 3,01 (3H, s); 2,80 (1H, s); 2,24 (2H, td, J = 6,6 Hz, 1,7 Hz); 2,03 (2H, qn, J = 7,5 Hz); 1,56 (2H, qn, J = 7,4 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, DMSO-d_6): δ = 158,6; 148,3; 136,7; 135,0; 129,5; 128,9; 127,1; 122,6; 119,2; 83,8; 71,7; 56,4; 28,5; 24,6; 19,7; 17,2. HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}^+ [\text{M}]^+$ -ra számított: 224,1434; mért: 224,1435.

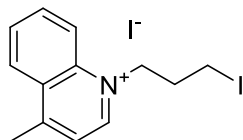


1,3-dijódpropán (55)

27,00 g (180 mmol, 6 ekv.) NaI-ot feloldottunk 100 ml acetonban és 3,00 ml (30,0 mmol, 1 ekv.) 1,3-dibrómpropánt hozzáadása után a reakcióelegyet 80 °C-on kevertettük 18 órán át. A kiváló csapadékot szűréssel eltávolítottuk és az oldószer bepárlását követően a kapott ragacsos nyersterméket 150 ml Et_2O -ben oldottuk/szuszendáltuk, majd 2×75 ml telített $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -oldattal, majd 1×50 ml vízzel és 1×50 ml telített NaCl-oldattal mostuk. MgSO_4 -on való szárítás után az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítva 8,26 g (95%) tiszta, fakósárga folyadékot kaptunk.

A szintézisnél 5,10 ml (50,0 mmol) 1,3-dibrómpropánból kiindulva és éter helyett DCM-t használva hasonló termelést értünk el, 13,62 g (94%) terméket kaptunk.

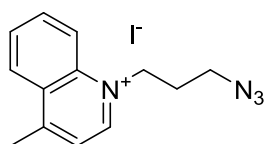
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 3,22 (2H, t, J = 6,9 Hz); 2,24 (2H, td, J = 6,9 Hz, 2,6 Hz); 1,96 (3H, m); 1,64 (2H, q, J = 7,2 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3): δ = 83,6; 68,9; 32,2; 29,0; 17,4; 6,0.



1-(3-jódpropil)-4-metilkinolínium jodid (56)

1,20 ml (9,0 mmol, 1 ekv.) lepidint (52) és 8,09 g (27,0 mmol, 3 ekv.) 1,3-dijódpropánt (55) 30 ml acetonitrilben 90 °C-on kevertettünk 20 óráig. Az oldószer eltávolítása után a visszamaradó nyersterméket 10 ml etil-acetátban szuszpendáltuk, szűrtük és kevés hideg EtOAc-cal mostuk. A kapott szilárd anyagot abs. etanolból átkristályosítva 3,55 g (90%) sárgászöld port kaptunk termékként.

Op. = 161-165 °C (bomlik). IR: $\nu(\text{neat})$ = 3002, 1602, 1530, 1402, 1369 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 10,29 (1H, d, J = 5,7 Hz); 8,57 (1H, d, J = 8,7 Hz); 8,38 (1H, d, J = 8,7 Hz); 8,24 (1H, t, J = 8,1 Hz); 8,01 (2H, m); 5,47 (2H, t, J = 7,5 Hz); 3,47 (2H, t, J = 6,2 Hz); 3,03 (3H, s); 2,69 (2H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, DMSO-d_6): δ = 158,7; 148,6; 136,7; 135,1; 129,5; 128,9; 127,1; 122,6; 119,0; 57,3; 32,9; 19,6; 1,5. HRMS (ESI): $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{IN}^+$ $[\text{M}]^+$ -ra számított: 312,0244; mért: 312,0241.



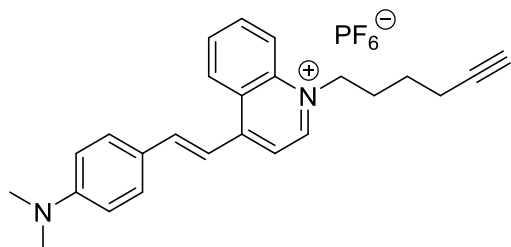
1-(3-azidopropil)-4-metilkinolínium jodid (57)

440 mg (1,0 mmol, 1 ekv.) 1-(3-jódpropil)-4-metilkinolínium jodidot (56) és 195 mg (3,0 mmol, 3 ekv.) NaN_3 -ot feloldottunk/szuszendáltunk 20 ml acetonitrilben, majd 90 °C-on kevertettük 18 órán át. Szobahőmérsékletre való hűtés után az oldhatatlan szervetlen sókat kiszűrtük és a szűrletet szárazra pároltuk. A nyerstermékhez 20 ml DCM-t adtunk és szilikapadon keresztül szűrtük, amit további 3 \times 20 ml DCM-nal mostunk. Az oldószer eltávolításával 228 mg (81%) sötétzöld kristályos terméket kaptunk, ami további tisztítást nem igényelt.

Méretnöveléskor 4,40 g (10,0 mmol) 56-ból kiindulva, 4 ekv. NaN_3 felhasználásával és 16 órás reakcióidővel 2,37 g (84%) termékhez jutottunk.

Op. = 118-119 °C (bomlik). IR: $\nu(\text{neat})$ = 3023, 2113; 1739; 1604; 1530; 1404 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 10,33 (1H, d, J = 6,0 Hz); 8,49 (1H, d, J = 8,7 Hz); 8,37 (1H, d, J =

8,5 Hz); 8,23 (1H, t, J = 8,5 Hz); 7,99 (2H, m); 5,48 (2H, t, J = 7,9 Hz); 3,77 (2H, t, J = 6,0 Hz); 3,03 (3H, s); 2,42 (2H, qn, J = 7,0 Hz). ^{13}C -NMR (62,5 MHz, DMSO- d_6): δ = 159,0; 149,1; 137,5; 136,3; 130,6; 129,9; 127,4; 123,7; 119,6; 55,4; 48,7; 29,8; 21,2. HRMS (ESI): $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3^+$ [M] $^+$ -ra számított: 227,1291; mért: 227,1290.

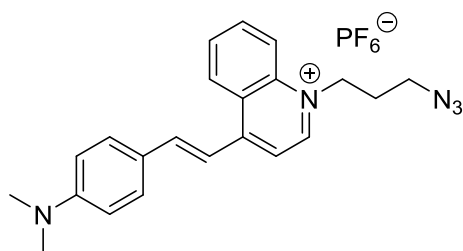


(E)-4-(4-(dimetilamino)sztiril)-1-(hex-5-in-1-il)kinolínium

hexafluorofoszfát (10a)

181 mg (0,5 mmol, 1 ekv.) **54** lepidínium só és 150 mg (1,0 mmol, 2 ekv.) 4-(dimetilamino)benzaldehydet (**58**) 25 ml etanolban oldottunk, majd 5 csepp (katalitikus mennyiségű) piperidin hozzáadása után 85 °C-on kevertettük 6 órán át, miközben az oldat színe egyre mélyülő lila lett. Az oldószer eltávolítása után a nyersterméket oszlopkromatográfián tisztítottuk (SiO_2 , MeCN \rightarrow MeCN + 1% NH_4PF_6) úgy, hogy az egyesített frakciókat ~15 ml térfogatúra koncentráltuk, majd 490 mg (3,0 mmol, 6 ekv.) NH_4PF_6 hozzáadása után egy órán át szobahőmérsékleten kevertettük, végül az oldószer bepárlása után a terméket kevés desztillált vízben szuszpendáltuk, szűrtük és hideg vízzel mostuk. Foszfor-pentaoxid felett, vákuumban való szárítás után 229 mg (89%) terméket kaptunk fekete, kékes csillogású szilárd anyagként.

Op. = 215-218 °C. IR: $\nu(\text{neat}) = 3189, 2922, 2106, 1735, 1523, 1315 \text{ cm}^{-1}$. ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 9,13 (1H, d, J = 6,7 Hz); 9,02 (1H, d, J = 8,4 Hz); 8,44 (1H, d, J = 8,9 Hz); 8,34 (1H, d, J = 6,8 Hz); 8,19 (1H, t, J = 7,8 Hz); 8,18 (1H, d, J = 15,6 Hz); 8,00 (1H, d, J = 15,6 Hz); 7,95 (1H, t, J = 7,8 Hz); 7,87 (2H, d, 8,9 Hz); 6,82 (2H, d, J = 8,9 Hz); 4,89 (2H, t, J = 7,5 Hz); 3,07 (6H, s); 2,80 (1H, t, J = 2,6 Hz); 2,25 (2H, td, J = 7,1 Hz, 2,6 Hz); 2,01 (2H, qn, J = 7,6 Hz); 1,57 (2H, qn, J = 7,4 Hz). ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ = 153,3; 152,3; 145,9; 144,9; 137,7; 134,6; 131,3; 128,3; 126,6; 126,1; 123,0; 118,7; 114,0; 113,0; 111,8; 83,8; 71,6; 55,3; 39,6; 28,3; 24,7; 17,2. HRMS (ESI): $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2^+$ [M] $^+$ -ra számított: 355,2169; mért: 355,2169.

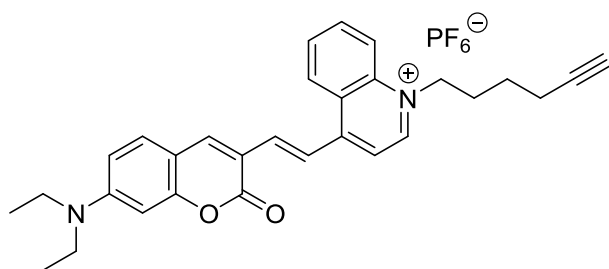


(E)-1-(3-azidopropil)-4-(4-(dimetilamino)sztiril)kinolínium

hexafluorofoszfát (10b)

60 mg (0,17 mmol, 1 ekv.) **57** lepidínium só 10 ml meleg EtOH-os oldatához 76 mg (0,50 mmol, 3 ekv.) (dimetilamino)benzaldehydet (**58**), majd 1 csepp (katalitikus mennyiségű) piperidint adtunk és a reakcióelegyet 85 °C-on keverettük 3 órán át. Az oldószer eltávolítása után a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO₂, DCM → MeOH/DCM = 1/9 V/V). A kapott terméket metanolban oldottuk, majd 165 mg (1,0 mmol, 6 ekv.) NH₄PF₆ hozzáadása után egy órán át szobahőmérsékleten kevertettük, végül az oldószer bepárlása után a terméket kevés desztillált vízben szuszpendáltuk, szűrtük és hideg vízzel és dietil-éterrel mostuk. Vákuumban való szárítás után 57 mg (67%) lilásfekete port kaptunk termékként.

Op. = 177-178 °C (bomlik). IR: $\nu(\text{neat}) = 2921, 2096, 1739, 1528, 1374 \text{ cm}^{-1}$. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 9,11$ (1H, d, J = 5,3 Hz); 9,03 (1H, d, J = 7,6 Hz); 8,42 (1H, d, J = 8,4 Hz); 8,35 (1H, d, J = 4,6 Hz); 8,20 (1H, m); 8,02 (1H, d, J = 15,9 Hz); 7,96 (1H, t, J = 6,8 Hz); 7,88 (2H, d, 6,8 Hz); 6,83 (2H, d, J = 7,6 Hz); 4,92 (2H, brs); 3,56 (2H, brs); 3,07 (6H, s); 2,20 (2H, brs). ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 153,5; 152,3; 146,2; 145,1; 137,8; 134,7; 131,4; 128,3; 126,6; 126,0; 123,0; 118,7; 114,0; 113,0; 111,8; 53,4; 47,8; 39,6; 28,2$. HRMS (ESI): C₂₂H₂₄N₅⁺ [M]⁺-ra számított: 358,2026; mért: 358,2026.



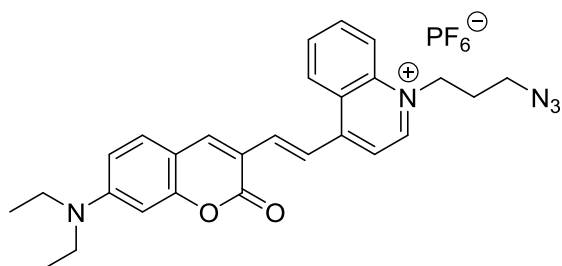
(E)-4-(2-(7-(diethylamino)kumarin-3-il)vinil)-1-(hex-5-inil)kinolínium

hexafluorofoszfát (11a)

100 mg (0,28 mmol, 1 ekv.) **54** lepidínium sót és 84 mg (0,34 mmol, 1,2 ekv.) 7-(diethylamino)-3-formilkumarint (**59**) 15 ml meleg etanolban oldottunk, majd 3 csepp (katalitikus mennyiségű) piperidin hozzáadása után 85 °C-on kevertettük 12 órán át. Az oldószer eltávolítása után a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO₂, MeCN → MeCN + 1% NH₄PF₆) úgy,

hogy az egyesített frakciókat ~10 ml térfogatúra koncentráltuk, majd 280 mg (1,7 mmol, 6 ekv.) NH_4PF_6 hozzáadása után egy órán át szobahőmérsékleten kevertettük, végül az oldószer bepárlása után a terméket kevés desztillált vízben szuszpendáltuk, szűrtük és hideg vízzel mostuk. Szárítás után 77 mg (45%) fekete, kékes csillogású port kaptunk termékként.

Op. = 232-234 °C. IR: $\nu(\text{neat}) = 3286, 2925, 1713, 1555, 1508, 1352 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9,28$ (1H, d, $J = 6,6 \text{ Hz}$); $8,75$ (1H, d, $J = 8,7 \text{ Hz}$); $8,53$ (1H, d, $J = 9,1 \text{ Hz}$); $8,52$ (1H, s); $8,47$ (1H, d, $J = 15,6 \text{ Hz}$); $8,40$ (1H, d, $J = 6,5 \text{ Hz}$); $8,25$ (1H, t, $J = 7,9 \text{ Hz}$); $8,06$ (1H, t, $J = 7,7 \text{ Hz}$); $8,04$ (1H, d, $J = 15,6 \text{ Hz}$); $7,57$ (1H, d, $9,0 \text{ Hz}$); $6,84$ (1H, dd, $J = 9,1 \text{ Hz}, 2,3 \text{ Hz}$); $6,65$ (1H, d, $J = 2,0 \text{ Hz}$); $4,96$ (2H, t, $J = 7,4 \text{ Hz}$); $3,52$ (4H, q, $J = 7,1 \text{ Hz}$); $2,81$ (1H, t, $J = 2,6 \text{ Hz}$); $2,26$ (2H, td, $J = 7,1 \text{ Hz}, 2,6 \text{ Hz}$); $2,04$ (2H, qn, $J = 7,7 \text{ Hz}$); $1,59$ (2H, qn, $J = 7,4 \text{ Hz}$); $1,17$ (6H, t, $J = 7,1 \text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 160,0; 156,5; 152,7; 152,2; 147,0; 145,2; 138,5; 137,8; 134,9; 130,9; 129,2; 126,4; 125,9; 119,1; 118,5; 115,6; 113,9; 110,2; 108,5; 96,3; 83,8; 71,7; 55,9; 44,4; 28,4; 24,7; 17,2; 12,3$. HRMS (ESI): $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2^+ [\text{M}]^+$ -ra számított: 451,2380; mért: 451,2378.

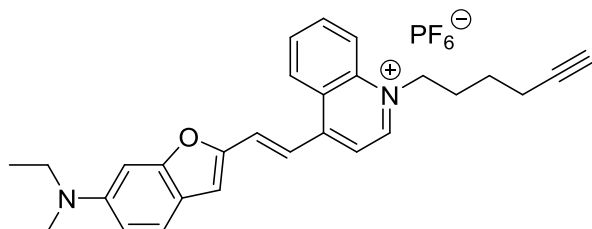


(E)-1-(3-azidopropil)-4-(2-(7-(dietilamino)kumarin-3-il)vinil)kinolínium hexafluorofoszfát (11b)

60 mg (0,17 mmol, 1 ekv.) **57** lepidínium só 20 ml meleg EtOH-os oldatához 84 mg (0,34 mmol, 2 ekv.) (dimetilamino)benzaldehydet (**58**), majd 2 csepp (katalitikus mennyiségű) piperidint adtunk és a reakcióelegyet 85 °C-on kevertettük 4 órán át. Az oldószer eltávolítása után a nyerterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO_2 , $\text{DCM} \rightarrow \text{MeOH/DCM} = 1/9 \text{ V/V}$). A kapott terméket metanolban oldottuk, majd 165 mg (1,0 mmol, 6 ekv.) NH_4PF_6 hozzáadása után egy órán át szobahőmérsékleten kevertettük, végül az oldószer bepárlása után a terméket kevés desztillált vízben szuszpendáltuk, szűrtük és hideg vízzel és dietil-éterrel mostuk. Vákuumban való szárítás után 54 mg (53%) sötétlila port kaptunk termékként.

Op. = 196-199 °C (bomlik). IR: $\nu(\text{neat}) = 2917, 2850, 2099, 1703, 1616, 1559, 1511 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9,27$ (1H, s); $8,76$ (1H, s); $8,52$ - $8,40$ (4H, m); $8,25$ (1H, s); $8,06$ (2H, s); $7,57$ (1H, m); $6,85$ (1H, s); $6,65$ (1H, s); $4,99$ (2H, s); $3,57$ (2H, s); $3,52$ (4H,

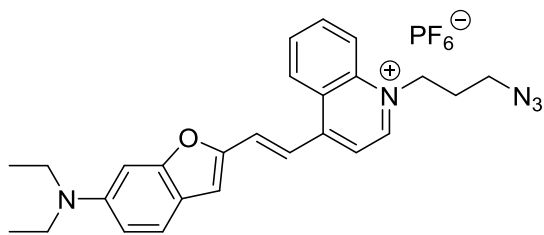
s); 2,23 (2H, m); 1,23 (6H, s); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ = 162,0; 159,9; 152,8; 149,1; 147,3; 145,2; 138,6; 136,6; 135,0; 130,9; 129,2; 126,4; 119,0; 118,5; 115,5; 113,8; 112,7; 110,2; 108,5; 96,3; 54,0; 47,7; 44,3; 28,9; 12,3. HRMS (ESI): $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_2^+$ $[\text{M}]^+$ -ra számított: 454,2238; mért: 451,2239.



**(E)-4-(2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)vinil)-1-(hex-5-in-1-il)kinolínium
hexafluorofoszfát (12a)**

100 mg (0,28 mmol, 1 ekv.) **54** lepidínium só és 128 mg (0,50 mmol, 1,8 ekv.) 6-(diethylamino)benzofurán-2-karbaldehid hidroklorid só (**60**) 15 ml meleg etanolban oldottunk, majd 55 μl (0,56 mmol, 2 ekv.) piperidin hozzáadása után 85 °C-on kevertettük 4 órán át. Az oldószer eltávolítása után a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO_2 , MeCN \rightarrow MeCN + 1% NH_4PF_6) úgy, hogy az egyesített frakciókat ~15 ml térfogatúra koncentráltuk, majd 280 mg (1,7 mmol, 6 ekv.) NH_4PF_6 hozzáadása után egy órán át szobahőmérsékleten kevertettük, végül az oldószer bepárlása után a terméket kevés desztillált vízben szuszpendáltuk, szűrtük és hideg vízzel mostuk. Termékként vákuumban való szárítás után 118 mg (73%) sötétvörös-fekete port kaptunk.

Op. = 166-170 °C. IR: $\nu(\text{neat})$ = 3288, 2972, 1630, 1551, 1396, 1352 cm^{-1} . ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 9,23 (1H, d, J = 6,0 Hz); 8,85 (1H, d, J = 8,4 Hz); 8,50 (1H, d, J = 8,8 Hz); 8,40 (1H, d, J = 6,5 Hz); 8,23 (1H, t, J = 7,9 Hz); 8,16 (1H, d, J = 15,3 Hz); 8,00 (1H, t, J = 7,7 Hz); 7,91 (1H, d, J = 15,3 Hz); 7,54 (1H, d, 6,2 Hz); 6,81 (2H, brs); 4,93 (2H, t, J = 7,4 Hz); 3,48 (4H, q, J = 7 Hz); 2,83 (1H, t, J = 2,6 Hz); 2,26 (2H, td, J = 7,1 Hz, 2,6 Hz); 2,03 (2H, qn, J = 7,6 Hz); 1,58 (2H, qn, J = 7,0 Hz); 1,16 (6H, t, J = 7,0 Hz). ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ = 158,7; 151,6; 150,9; 148,5; 146,5; 137,8; 134,8; 129,6; 128,9; 126,2; 126,1; 123,1; 119,0; 115,4; 115,2; 115,0; 110,6; 91,9; 83,8; 71,7; 55,7; 44,3; 40,0; 28,4; 24,7; 17,2; 12,3. HRMS (ESI): $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}^+$ $[\text{M}]^+$ -ra számított: 423,2431; mért: 423,2432.



**(E)-1-(3-azidopropil)-4-(2-(6-(dietilamino)benzofuran-2-il)vinil)kinolínium
hexafluorofoszfát (12b)**

60 mg (0,17 mmol, 1 ekv.) **57** lepidínium só 15 ml meleg EtOH-os oldatához 127 mg (0,50 mmol, 3 ekv.) 6-(dietilamino)benzofurán-2-karbaldehid hidroklorid só (60), majd 55 µl (0,56 mmol, 3,3 ekv.) piperidint adtunk és a reakcióelegyet 85 °C-on kevertettük 5 órán át. Az oldószer eltávolítása után a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (SiO₂, DCM → MeOH/DCM = 1/9 V/V). A kapott terméket metanolban oldottuk, majd 165 mg (1,0 mmol, 6 ekv.) NH₄PF₆ hozzáadása után egy órán át szobahőmérsékleten kevertettük, végül az oldószer bepárlása után a terméket kevés desztillált vízben szuszpendáltuk, szűrtük és hideg vízzel és dietil-éterrel mostuk. Vákuumban való szárítás után 67 mg (69%) vöröses fekete port kaptunk terméként.

Op. = 162-166 °C. IR: $\nu(\text{neat}) = 2920, 2097, 1737, 1582, 1511, 1396 \text{ cm}^{-1}$. ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 9,20$ (1H, s); 8,81 (1H, d, J = 6,0 Hz); 8,45 (1H, d, J = 6,8 Hz); 8,37 (1H, s); 8,21 (1H, s); 8,14 (1H, d, J = 15,8 Hz); 7,98 (1H, s); 7,87 (1H, d, J = 15,8 Hz); 7,51 (1H, s); 7,35 (1H, s); 6,79 (2H, brs); 4,95 (2H, s); 3,57 (2H, s); 3,46 (4H, s); 2,22 (2H, s); 1,16 (6H, brs). ¹³C-NMR (62,5 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 158,7; 151,7; 150,9; 148,5; 146,7; 137,8; 134,8; 129,6; 128,9; 126,1; 126,0; 124,3; 123,0; 118,7; 117,5; 115,5; 114,9; 110,6; 91,9; 53,8; 47,8; 44,3; 28,3; 12,3$. HRMS (ESI): C₂₆H₂₈N₅O⁺ [M]⁺-ra számított: 426,2288; mért: 426,2289.

A 10, 11 és 12 jelzővegyületek méretnövelt szintézise grammos mennyiségben.

1 ekvivalens lepidínium só (54 vagy 57) és 3 ekvivalens aldehidet (58, 59 vagy 60) feloldottunk 200 ml meleg etanolban, majd 0,2 ekvivalens trietilamint adtunk hozzá (60 esetében a hidroklorid só miatt 3,2 ekvivalnest). A reakcióelegyet 85 °C-on 3 órán keresztül kevertettük, de 2,5 óra elteltével VRK-s mintát vettünk, és ha a kiindulási lepidínium só elfogyását tapasztaltuk (MeOH/DCM = 1/9 V/V), akkor hamarabb leállítottuk a reakciót. Az oldószert vákuumrotációs bepárlón eltávolítottuk és a nyersterméket DCM oldószerezrel szilikapadra vittük és DCM-nal (58) vagy MeOH/DCM = 1/100 V/V eluenssel (59, 60) addig mostuk, amíg a maradék kiindulási anyag el nem fogyott belőle. Ekkor MeOH/DCM = 1/9 V/V elegyre váltottunk és a céltermék teljes leoldódásáig folytattuk a mosást. A frakciók egyesítése után

eltávolítottuk róluk az oldószert, a visszamaradó ragacsos, sötét anyagot pedig minimális mennyiségű EtOH/H₂O elegyben (**10** esetén 1/1 V/V, **11** és **12** esetén pedig 2/1 V/V) oldottuk fel, ultrahangos fürdő és hőlégfúvóval való melegítés segítségével. A teljes feloldódás után 8 ekvivalens NH₄PF₆ 1 mol/dm³-es vizes oldatát kevertetés közben adtuk hozzá, melynek hatására azonnal megindult a csapadékkiválás. További 15 perc kevertetés után a kivált célterméket üvegszűrőn, vízlégszivattyú segítségével szűrtük és először az alkalmazott oldószerkelet kis mennyiségével (a feloldáshoz szükséges körülbelül 10%-ával) mostuk, majd desztillált vízzel mindaddig, amíg a lecsöpögő, kezdetben szinte színtelen vagy halványsárga szűrlet rózsaszín-pirosas színűvé nem vált, ezzel jelezve, hogy már nem tartalmaz fölös PF₆⁻ anionokat. Végül hideg dietil-éteres mosási lépéssel eltávolítottuk a víz nagy részét és a terméket vákuumban tömegállandóságig szárítottuk. A kapott anyagok minden esetben sötét, kékes, lilás vagy pirosas, szinte fekete porok, melyek tisztasága LC-UV/VIS-MS vizsgálat alapján legtöbbször 99% feletti, de minden esetben legalább 97% volt. Az egyes vegyületek esetében elért kitermeléseket a 13. táblázatban foglaltuk össze. Ahol a reakciót többször is elvégeztük, ott az eredményeket külön feltüntettük.

	54 / 57 mennyisége	Termelés	
10a	5,0 mmol	2,33 g (93%)	2,40 g (96%)
10b	5,0 mmol	2,14 g (85%)	
11a	3,0 mmol	1,61 g (90%)	1,59 g (89%)
11b	2,5 mmol	1,14 g (76%)	1,05 g (70%)
12a	3,0 mmol	1,59 g (93%)	
12b	2,5 mmol	1,24 g (87%)	

13. táblázat. A jelzővegyületek méretnövelt, optimalizált előállításakor elért termelések.

Érdemes megjegyezni, hogy feleslegben vett 3 ekvivalens aldehidből az elválasztási lépés során átlagosan 1,2-1,6 ekvivalenst közel tisztán vissza tudtunk nyerni, ami így a következő előállítás során újra felhasználható.

6.3. Szekvenciális jelölés gélelektroforetikus vizsgálata

A KGDTHFPIC cisztein oldalláncán történő szekvenciális jelölés vizsgálatához elsőként előállítottuk és izoláltuk a bifunkcionális hírvivővel módosított KGDTHFPIC-**2** peptidet és a fluoreszcensen megjelölt KGDTHFPIC-**5** konjugátumot. A gélkromatográfiás vizsgálatokhoz a következő oldatokat és reakcióelegyeket készítettük el és vittünk fel belőlük mintát a gélre (a számozás megegyezik a 24. ábrán láthatóval):

1. 1 µg/ml KGDTHFPIC desztillált vízben.
2. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**2** desztillált vízben.
3. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**5** desztillált vízben.
4. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**2** + 2 ekv. **30** desztillált víz és DMSO elegyében.
5. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**2** HEPES pufferben + 2 ekv. **30** DMSO-ban + 2,5 ekv nátrium-L-aszkorbát (10 mM oldat) + 2,5 ekv. CuSO₄-TBTA (10 mM oldat), majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 20 órán át.
6. 1 µg/ml KGDTHFPIC HEPES pufferben + 2 ekv. **5** DMSO-ban, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 20 órán át.
7. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**5** desztillált vízben.
8. 1 µg/ml KGDTHFPIC HEPES pufferben + 2 ekv. **5** DMSO-ban, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 20 órán át.
9. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**2** HEPES pufferben + 2 ekv. **30** DMSO-ban + 2,5 ekv nátrium-L-aszkorbát (10 mM oldat) + 2,5 ekv. CuSO₄-TBTA (10 mM oldat), majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 20 órán át.
10. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**2** HEPES pufferben + 2 ekv. **31** DMSO-ban + 2,5 ekv nátrium-L-aszkorbát (10 mM oldat) + 2,5 ekv. CuSO₄-TBTA (10 mM oldat), majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 20 órán át.
11. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**2** HEPES pufferben + 2 ekv. **32** DMSO-ban + 2,5 ekv nátrium-L-aszkorbát (10 mM oldat) + 2,5 ekv. CuSO₄-TBTA (10 mM oldat), majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 20 órán át.
12. 1 µg/ml KGDTHFPIC-**2** HEPES pufferben + 2 ekv. **33** DMSO-ban + 2,5 ekv nátrium-L-aszkorbát (10 mM oldat) + 2,5 ekv. CuSO₄-TBTA (10 mM oldat), majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 20 órán át.

6.4. Kinetikai vizsgálatok

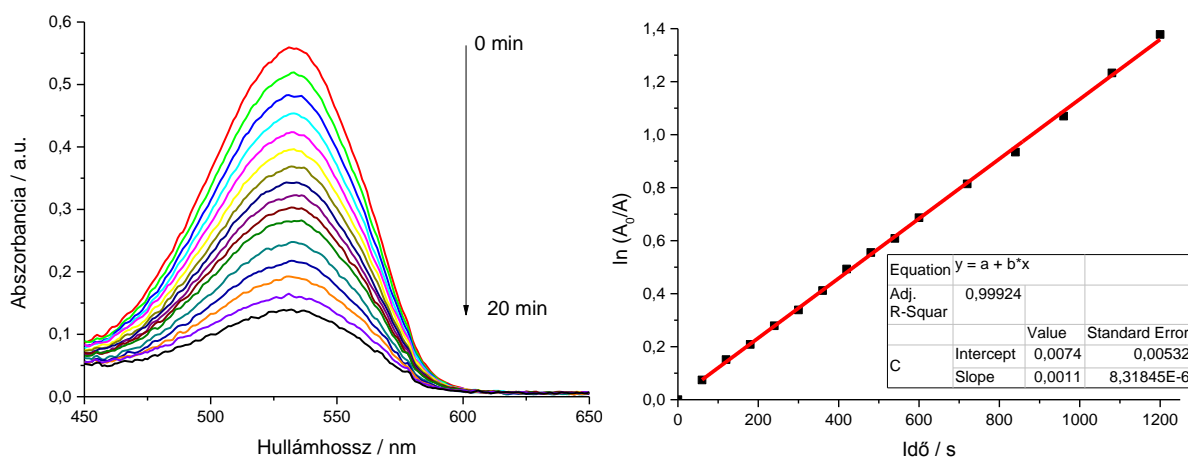
Etil-vinil-éterrel

Az egyes tetrazinokból $c = 10^{-3}$ M koncentrációjú oldatokat készítettünk. A kinetikai mérésekkor ezek 2 – 2 ml-éhez a pszeudo-elsőrendű körülmények biztosításához 20 μ l EVE-t (0,21 mmol, 104 ekv., így $c = 0,103$ M) adtunk, majd követtük az abszorbancia (A) csökkenését az egyes tetrazinokra jellemző abszorbancia-maximum hullámhosszakon (14. táblázat). A kapott adatokból kiszámítottuk az $\ln(A_0/A)$ értékeket, melyeket az idő függvényében ábrázolva és erre egyenest illesztve kaptuk a k' látszólagos sebességi állandókat. Ezeket elosztva a $c_{\text{EVE}} = 0,103$ M konstanssal jutottunk a megfelelő k_2 sebességi állandókhoz.

A vizsgálatokat DMSO/H₂O = 9/1 V/V oldószerben és 24 – 28 °C (általában 25 °C) hőmérsékleten végeztük. A sebességi állandók feltüntetett értékei minden esetben három független mérés eredményeinek átlaga. Az 52. ábrán egy példa látható a **9** tetrazinnal végzett mérésekből.

Tetrazin	DPT	6	7	8	9
λ_{max} (abs) / nm	528	530	534	520	532

14. táblázat. A tetrazinok abszorbancia-maximum hullámhossza a 450–650 nm-es tartományban.



52. ábra. A **9** tetrazin abszorpciós spektrumának változása etil-vinil éter jelenlétében és az $\ln(A_0/A)$ értékeknek az idő függvényében való ábrázolásból kapható k' érték bemutatása.

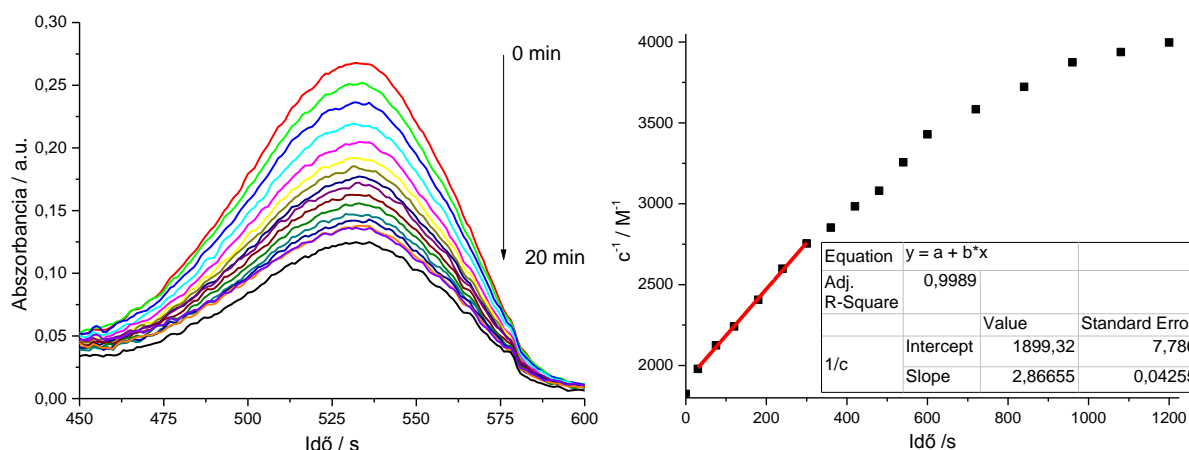
CyO ciklooktinnal

Az egyes tetrazinokból és a CyO (**40**) ciklooktinnál is $c = 10^{-3}$ M koncentrációjú oldatokat készítettünk, majd a mérések kezdetekor mindkettőből 1 – 1 ml-t kevertünk össze a küvettában és követtük az abszorbancia csökkenését az egyes tetrazinokra jellemző abszorbancia-maximum hullámhosszakon. A kapott abszorbancia adatokból az adott pillanatban való tetrazin-koncentrációt (ami megegyezik a CyO-koncentrációval) a Lambert-Beer-törvény ($A = \varepsilon \times l \times c$) alapján számítottuk ki ($l = 1$ cm). Ehhez meghatároztuk a tetrazinok moláris abszorpciós koefficiensét (15. táblázat), melyhez hígítási sort készítve mértük az abszorbanciát és azt koncentráció függvényében ábrázolva a pontokra illesztett egyenes meredeksége adta meg az ε értéket. Ennek segítségével kiszámítottuk az egyes mérési pontokhoz rendelhető koncentrációkat, majd a $1/c$ – idő függvény kezdeti, lineáris szakaszára illesztett egyenes meredekségéből kaptuk meg a k_2 sebességi állandókat.

A vizsgálatokat DMSO/H₂O = 9/1 V/V oldószerben és 24 – 28 °C (általában 25 °C) hőmérsékleten végeztük. A sebességi állandók feltüntetett értékei minden esetben három független mérés eredményeinek átlaga. Az 52. ábrán egy példa látható a **9** tetrazinnal végzett mérésekből.

Tetrazin	6	8	9
$\varepsilon / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	308	6,25	531

15. táblázat. A tetrazinok moláris abszorpciós együtthatói az abszorpciós hullámhossz maximumumokon.

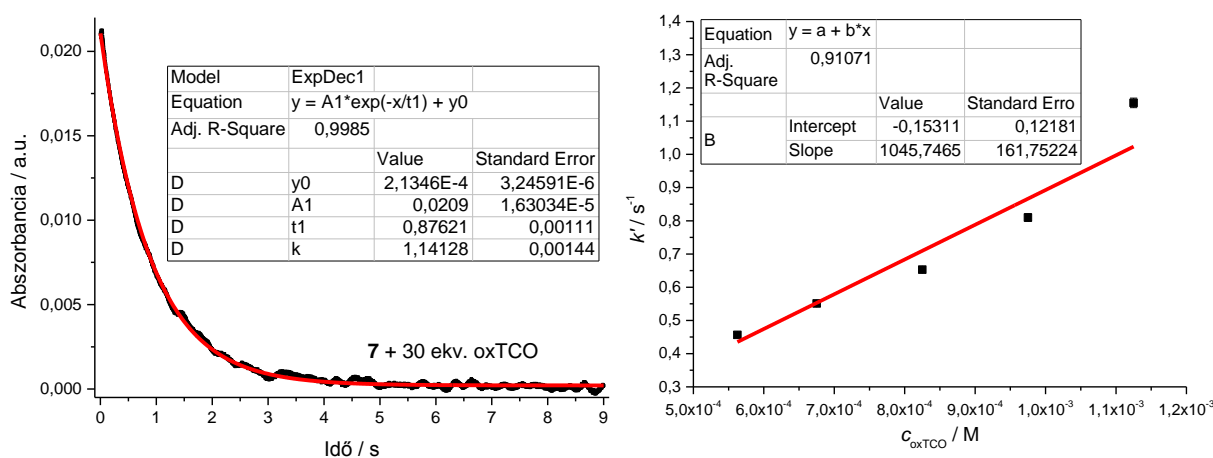


53. ábra. A **9** tetrazin abszorpciós spektrumának változása CyO-val való reakciójában és az $1/c$ értékeknek az idő függvényében való ábrázolásból kapható k_2 érték bemutatása.

oxTCO-val, COMBO-val és TCO-val

Az oxTCO-val (41), COMBO-val (42) és TCO-val (43) való mérések során pszeudo-elsőrendű körülményeket biztosítottunk, azonban a reakciók nagyon gyors (pár másodperces) lefutása miatt a hagyományos módszer helyett stop-flow technikát alkalmaztunk. Mivel a mérések eredményeképp a teljes exponenciális görbét megkaptuk, így közvetlenül az abszorbancia – idő függvény pontjaira illesztettünk exponenciális görbét, így jutva a k' látszólagos sebességi állandókhoz. A kísérletet több dienofil koncentrációval is elvégezve az egy k' értékeket a koncentráció függvényében ábrázoltuk és az illesztett egyenesek meredeksége szolgáltatta a k_2 másodrendű sebességi állandókat.

A vizsgálatokat közel fiziológiás körülmények között, 1% DMSO-ot tartalmazó PBS pufferben (pH = 7,2), 36 °C-on végeztük. A k' sebességi állandókat minden esetben legalább 10, de általában több független mérés eredményeinek átlagaként kaptuk meg, melyekhez a tetrazinokból $c = 3,75 \times 10^{-5}$ M koncentrációjú oldatokat készítettünk, míg a dienofilekből $5,625 \times 10^{-4}$ M (15 ekv.), $6,75 \times 10^{-4}$ M (18 ekv.), $8,25 \times 10^{-4}$ M (22 ekv.), $9,75 \times 10^{-4}$ M (26 ekv.) és $1,125 \times 10^{-3}$ M (30 ekv.) koncentrációkat, majd 50 – 50 μ l oldatokat injektáltunk egyszerre. Az 54. ábrán egy példa látható a 7 tetrazinnal és oxTCO-val végzett mérésekből.



54. ábra. A k' és k_2 sebességi állandók meghatározásának bemutatása a 7.

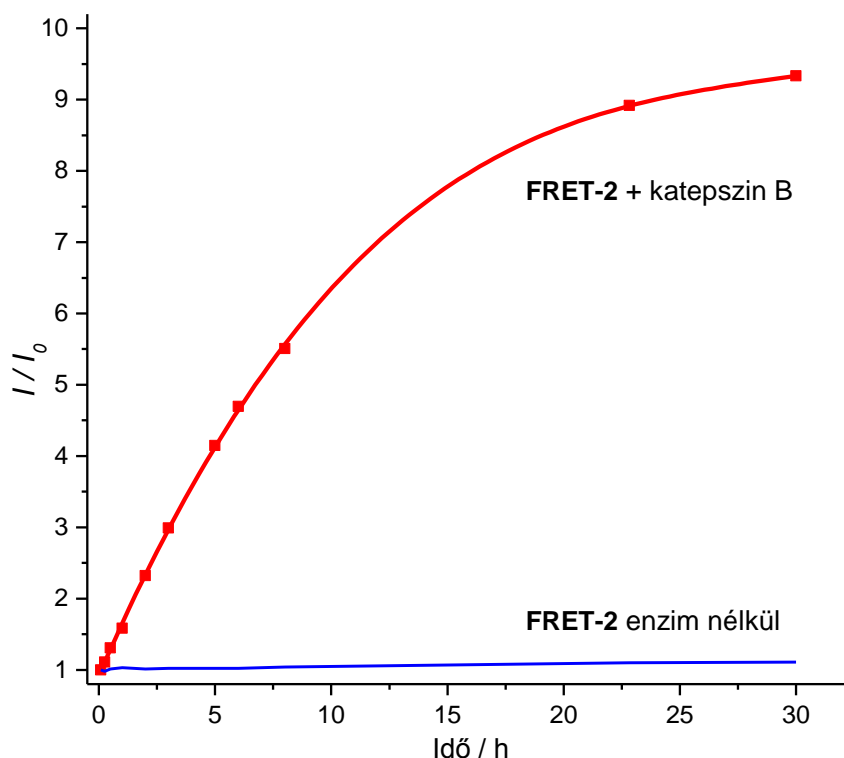
6.5. Spektroszkópiai vizsgálatok

Lepidínium-vázas fluorofórok

Az előállított fluoreszcens jelzővegyületek gerjesztési és emissziós spektrumait $c = 10^{-6}$ M koncentrációjú oldatokból vettük fel. Az abszorpciós hullámhossz-maximumokat és az ezekhez tartozó moláris abszorpciós koefficiens $10^{-6} - 3 \times 10^{-5}$ M-os hígítási sorok alapján határoztuk meg. A fluoreszcens kvantumhasznosítási tényezők megállapításához a relatív módszert alkalmaztuk, melyben összehasonlításként a krezilibolya metanolos oldatát ($\Phi_F = 0,54$) használtuk. Ehhez mindegyik új és a referencia fluorofórból azonos abszorbanciával rendelkező oldatokat készítettünk, majd meghatároztuk az emissziós spektrumok görbe alatti területét és ezek arányából, az oldószerek törésmutatójával korrigálva, kaptuk meg a jelzővegyületekre jellemző értékeket. A vizsgálatokhoz fagyasztás-olvasztás módszerrel gázmentesített oldószereket használtunk fel.

A FRET-2 rendszer

A **FRET-2** rendszer előállításának utolsó lépésében a CyO-CONH-YRRL-Dau (**66**) + **10b** reakció fluoreszcens követését 592 nm-en, daunomicin jellemző emissziós hullámhossz-maximumán végeztük, a peptidet $c = 10^{-6}$ M, a fluorofórt pedig $c = 1,5 \times 10^{-6}$ M koncentrációban tartalmazó 5V/V% DMSO/H₂O oldószerben, 25 °C-on. A konjugátum katepszin B enzimmel való hasításának vizsgálatához a **FRET-2** szubsztrátot 5×10^{-5} M, az enzimet pedig 5×10^{-6} M koncentrációban tartalmazó puffer-oldatot készítettünk (pH = 5, 0,1 M NaOAc, 0,01 M DTT és 0,002 M EDTA), melyet 37 °C-on kevertettünk. Ebből adott időközönként 50 – 50 µL mintát vettünk, a pufferrel 2,50 ml-re hígítottuk (végső koncentráció $c = 10^{-6}$ M) és 592 nm-en vizsgáltuk a fluoreszcencia intenzitását. Kontroll kísérletként a konjugátum azonos, de enzimet nem tartalmazó oldatát készítettük el, melynek esetében nem tapasztaltuk a fluoreszcencia számottevő változását (55. ábra).

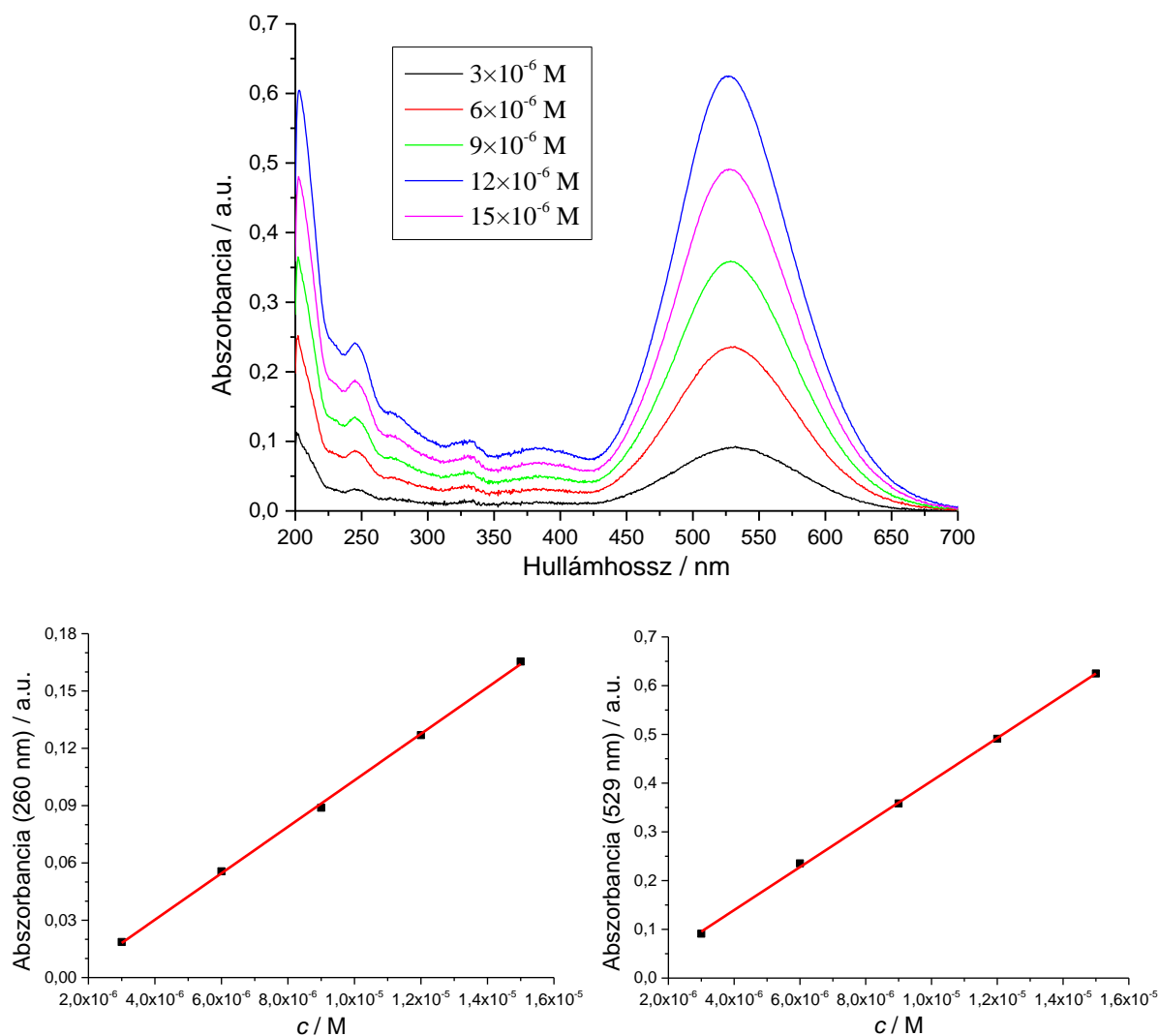


55. ábra. A fluoreszcens intenzitás változása 592 nm-en a **FRET-2** katepszin B-vel való hidrolízise során (piros) és az enzimet nem tartalmazó kontroll (kék).

A 11 jelzővegyület fluoreszcenciájának polaritás-függés vizsgálata

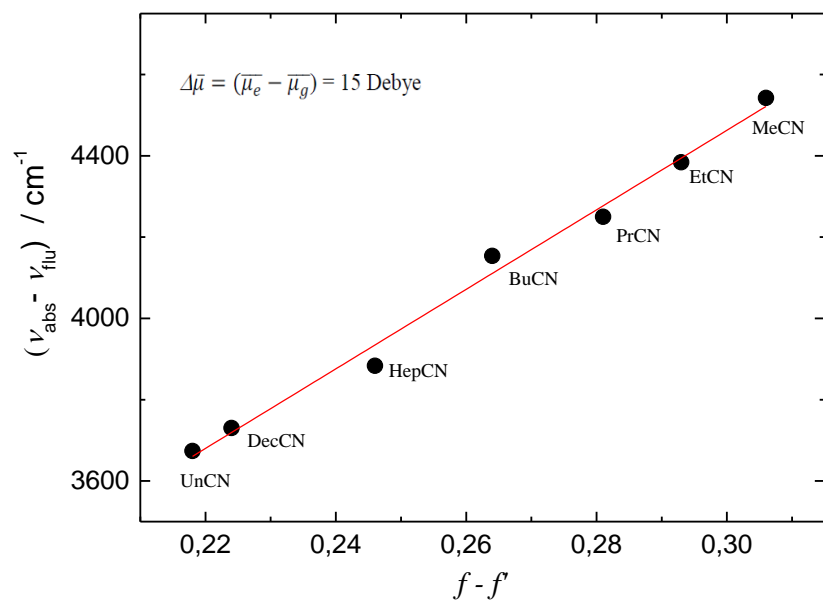
A jelölt DNS mennyiségének és koncentrációjának meghatározásához szükség volt a **11** jelzővegyület fiziológiás körülmények közötti moláris abszorpciós együtthatójának meghatározására 260 és 529 nm-en, melyet NaPi pufferben (pH = 7, 10 mM) készült oldatból végeztünk el, hígítási sor készítésével (55. ábra). Az így kapott értékek: ε (260 nm) = $12163 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ε (529 nm) = $44123 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Az oligonukleotidok **11b**-vel történő jelölésekor tapasztalt nagymértékű fluoreszcens intenzitás növekedés tanulmányozásához vízmentes, spektroszkópai tisztaságú oldószerekkel készült $c = 10^{-2} \text{ M}$ koncentrációjú oldatokat használtuk fel, melyeknek felvettük az abszorpciós és emissziós spektrumokat (50. ábra). A felhasznált oldószerek: acetonitril (MeCN), propionitril (EtCN), butironitril (PrCN), valeronitril (BuCN), oktilnitril (HepCN), undecilnitril (DecCN), dodecilnitril (UnCN). A H-hidak hatásának vizsgálatakor történő, a víz apránként való adagolásából eredő hígulást korrigáltuk (51. ábra).



56. ábra. A **11** jelzővegyület moláris abszorpciós együtthatóinak meghatározása.

Az alap és gerjesztett állapotok dipólusmomentumai közötti különbség ($\bar{\Delta}\mu_g$) számításához az $\nu_{abs} - \nu_{flu} = \frac{1}{2\pi\epsilon_0\hbar c\rho^3} (\bar{\mu}_e - \bar{\mu}_g)^2 (f - f') + konst.$ összefüggést használtuk fel, ahol $(\nu_{abs} - \nu_{flu})$ a Stokes eltolódás hullámszámban kifejezve, $(f - f')$ pedig az ún. Onsager paraméter és az oldószerek dielektromos állandójából (ϵ) és törésmutatójából (n) kapható meg az $(f - f') = (\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1) - (n^2 - 1)/(2n^2 + 1)$ egyenlet segítségével. Így $(\nu_{abs} - \nu_{flu})$ -t ábrázolva az Onsager-paraméter függvényében a kapott pontokra egyenest illesztve kaphatjuk meg gerjesztés hatására bekövetkező dipólusmomentum-változás értékét, ami a számítások után 15 Debye-nak adódott (57. ábra).



57. ábra. A Stokes-eltolódás az Onsager oldószer-polaritás paraméter függvényében.

7. Összefoglalás

Doktori munkám során a fluoreszcens jelzés bevitelére alkalmas bioortogonális ligációs eljárások fejlesztésével foglalkoztam. Kutatásaim eredményeiként ciszteinre-specifikus vinil-szulfon kémiai hírvivőket és fluoreszcens jelzővegyületeket, fordított elektronigényű Diels-Alder reakcióban felhasználható reaktív tetrazinszármazékokat, és a távoli vörös – közeli IR tartományban emittáló mega-Stokes fluoreszcens jelzővegyületeket állítottam elő. A jobb hozamok érdekében több esetben optimalizáltam a szintetikus eljárásokat, valamint vizsgáltam az előállított vegyületek tulajdonságait és felhasználhatóságukat.

A vinil-szulfon motívumra épülő, alkin vagy azid csoportot hordozó hidrofil bifunkciós vegyületekkel (**1**, **2**) cisztein-specifikus szekvenciális jelölést valósítottunk meg. Bizonyítottuk, hogy a reakció fiziológiás körülmények között gyorsan és szelektíven játszódik le, illetve a kémiai hírvivőkkel módosított peptidek a következő lépésben bioortogonális reakcióval fluorogén jelzővegyületekkel jelölhetőek meg, rámutatva a kétlépéses eljárás előnyére a közvetlen, egylépéses fluoreszcens jelöléssel (**5**) szemben.

A tetrazinokkal végzett kutatások során nikotinsavra épülő szimmetrikus (**6**), nem-szimmetrikus (**7**) és monoszubsztituált (**8**) származékokat állítottunk elő, melyekkel az elektronikus és szterikus effektusok reakciósebességre való hatását vizsgáltuk különböző dienofilekkel szemben. Megmutattuk, hogy az elektronszívó, ám nagy térigényű szubsztituens elhagyásával nő a tetrazinok reaktivitása. A tapasztalt kísérleti eredményeket pedig olyan elméleti kémiai számításokkal is alátámasztottuk, melyben a dienofil partnert is figyelembe vevő átmeneti állapotok alapján számított aktiválási gátakból következtettünk a reakciósebességek viszonyára. Megvizsgálva az előállított tetrazinok fiziológiás körülmények közötti stabilitását, a nem-szimmetrikus származék felhasználásával olyan bioortogonalizált dezoxiuridin nukleotid építőelemet terveztünk, melyet, annak oligonukleotid láncba építése után, ciklooktinnal funkcionalizált fluoreszcens festékkel tudtunk megjelölni.

Bioortogonális ligációs eljárásokban használható fluoreszcens jelzővegyületek fejlesztése terén a lepidínium vázelem felhasználásával azid és alkin funkciós csoportokkal ellátott, mega-Stokes tulajdonságot mutató és a távoli vörös – közeli IR tartományban emittáló fluorofórokat állítottunk elő (**10**, **11**, **12**). A kereskedelmi forgalmazás során felmerülő igények kielégítéséhez a reakciókörülmények optimalizálásával gyors, jó termelést és tisztaságot biztosító szintetikus eljárást dolgoztunk ki. Kihasználandó a nagy Stokes-eltolódásból eredő előnyöket az egyik fluorofór (**10**) segítségével a daunomicin rákellenes gyógyszer fluoreszcenciájának hatékony

modulálását lehető tevő FRET rendszert terveztünk. Hasonló konjugátum segítségével tervezzük a daunomicin *in vivo* körülmények közötti felszabadulásának és az ezzel együtt járó, sejthalált kiváltó hatásának vizsgálatát. Az előállított jelzővegyületek egy másik tagjával **(11)** alkin funkciós csoporttal ellátott oligonukleotidok fluoreszcens jelölését valósítottuk meg, melynek során a fluoreszcens intenzitás nagymértékű növekedését értük el. A jelenséget a fotofizikai kísérletek alapján a lokális polaritás megváltozásával magyarázhattuk, mely egyben rámutatott a fluoreszcens jelzés kapcsolódási pontjának fontosságára, és a komplementer szállal való hibridizáció után kialakuló kettős szálaban elhelyezkedő különböző pozíciójára.

8. Summary

My PhD research aimed at studying and developing diverse elements of fluorescent bioorthogonal labeling schemes. This work included the synthesis of cysteine-specific vinyl-sulfone bearing chemical reporters and fluorescent labels, reactive tetrazine derivatives for inverse electron-demand Diels-Alder reactions, and a set of new azide- and alkyne-bearing lepidinium-based fluorophores with mega-Stokes properties and far red – near IR emission. I also examined the chemical biology application scope and limitations of these new reagents.

Cysteine-specific labeling of peptides was achieved by hydrophilic, azide or alkyne containing bifunctional chemical reporters (**1**, **2**). Systematic studies have demonstrated that these water soluble vinyl-sulfones have strong and chemoselective affinity towards thiol groups under physiological conditions. In peptide tagging experiments these bifunctional linkers have been shown to be suitable for further modification, e.g., with azide containing fluorogenic labels. Comparison of labeling schemes justified the advantages of the two-step sequential labeling strategy over one-step direct approaches (**5**).

The second topic involved the synthesis of symmetrical (**6**), non-symmetrical (**7**) and monosubstituted (**8**), nicotinamide-derived tetrazines. The Diels-Alder reactivity of these tetrazines towards different dienophiles was investigated. These studies revealed that the steric demand of substituents plays a prominent role in the Diels-Alder reactivity of electron-deficient tetrazines. For example, elimination of one of the large electron-withdrawing substituents can lead to increased reaction rates. These findings were supported by theoretical investigations as well and a new prediction model based on transition-state activation energies was proposed. Besides reactivity, the stability of these new tetrazines was also studied. It was found that the least reactive, non-symmetrically decorated tetrazine can stand physiological conditions for longer times. This scaffold was used in the design of a bioorthogonalized nucleic acid building block, which, after incorporation into an oligonucleotide sequence was labeled with a cyclooctyne-modified fluorescent probe.

The new azide- and alkyne-bearing lepidinium-based fluorophores (**10**, **11**, **12**), designed for bioorthogonal labeling schemes, exhibited large Stokes-shifts with emission maxima in the far red – near-infrared region with optimal spectral bands for excitation by cheap, commercially available laser sources. To satisfy the demands of commercial production, a synthetic pathway with short reaction times, good yields and high purity was developed. To study the use of these probes in energy transfer systems, dually labeled model compounds including a fluorescent

anticancer drug, daunomycin, and one of our new dyes (**10**) were synthesized. It was demonstrated that the fluorescence of Dau can be efficiently modulated and a 90% quenching of the daunomycin fluorescence was achieved. Upon separation of the two fluorophores by means of enzymatic cleavage the Dau signal was fully recovered. Similar constructs are to be used in the future to study the *in vivo* release of daunomycin from conjugates in order to study the mechanism of action of the accompanying Dau-regulated cell death processes. Another member of the new fluorophores (**11**) was used in the fluorescent postsynthetic modification of alkyne-functionalized oligonucleotide chains. Upon conjugation of the dye to the oligonucleotide scaffolds strong fluorescence intensity enhancements were observed. The increase can be explained by the local polarity change around the fluorophore units. Detailed studies revealed the importance of the relative position of the probes in the conjugates.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, *Dr. Kele Péternek* doktori munkám szakmai irányításáért, az évek során kapott rengeteg tanácsért és baráti támogatásért, és hogy minden lehetőséget biztosított kutatásaimhoz és külföldi utazásaimhoz.

Köszönöm továbbá kutatócsoportunk minden jelenlegi és korábbi tagjának az évek alatt nyújtott sok segítséget, lelkesítést és a baráti légkört, különösen: *Dr. Herner Andrásnak, Demeter Orsolyának, Knorr Gergelynek, dr. Kozma Eszter Erikának, Söveges Biankának és Varga R. Baláznak.*

Köszönettel tartozom *Dr. Novák Zoltánnak*, aki szükség esetén mindig tudott segíteni, és csoportja tagjainak, akiknek hála jó hangulatban teltek a napok, és bármikor készek voltak megosztani idejüket és tapasztalatukat: *Dr. Kovács Szabolcsnak, Dr. Szabó Fruzsínának, Dr. Tolnai Gergely Lászlónak, Gonda Zsombornak, Sinai Ádámnak, Tischler Orsolyának.*

Köszönet a Wagenknecht csoportnak (KIT, Karlsruhe) és MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport tagjainak, főként *Dr. Effi Bätzner, Dr. Claudia Stubinitzky, Baranyai Zsuzsa és Enyedi Kata Nóra* szerzőtársaimnak az oligonukleotidok és peptidek szintéziséért és jelölési reakciókban való együttműködésért. Külön köszönöm *Dr. Demeter Attilának*, hogy segített a fluoreszcens vizsgálatokban és bármilyen váratlan fejlemény kivizsgálásában.

Szeretném megköszönni *családomnak*, hogy tanulmányaim során mindenben támogattak és segítettek.

10. Irodalomjegyzék

- ¹ B. Valeur *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2002**.
- ² J. R. Lakowicz *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Publishing, **2006**.
- ³ http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/.
- ⁴ http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/.
- ⁵ C. P. Ramil, Q. Lin *Chem. Commun.* **2013**, 49, 11007.
- ⁶ D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 592.
- ⁷ P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, R. A. Keller *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 607.
- ⁸ B. Huang, M. Bates, X. Zhuang *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 993.
- ⁹ R. Weissleder *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 316.
- ¹⁰ P. Czerney, M. Wenzel, B. Schweder, F. Lehmann; US20040260093 ed. **2004**.
- ¹¹ J. T. Alander, I. Kaartinen, A. Laakso, T. Patila, T. Spillmann, V. V. Tuchin, M. Venermo, P. Valisuo *Int. J. Biomed. Imaging* **2012**, 2012, 940585.
- ¹² R. C. Benson, H. A. Kues *Phys. Med. Biol.* **1978**, 23, 159.
- ¹³ T. Schmidt, U. Kubitscheck, R. Rohler, U. Nienhaus *Single Mol.* **2002**, 3, 327.
- ¹⁴ A. Nadler, C. Schultz *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 2408.
- ¹⁵ G.-J. Kremers, S. G. Gilbert, P. J. Cranfill, M. W. Davidson, D. W. Piston *J. Cell Sci.* **2011**, 124, 157.
- ¹⁶ Y. Ohba, Y. Fujioka, S. Nakada, M. Tsuda *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, 113, 313.
- ¹⁷ O. S. Wolfbeis *Chem. Soc. Rev.* **2015**, doi: 10.1039/c4cs00392f.
- ¹⁸ L. Davis, J. W. Chin *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, 13, 168.
- ¹⁹ J. M. Gilmore, R. A. Scheck, A. P. Esser-Kahn, N. S. Joshi, M. B. Francis *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 5307.
- ²⁰ L. Yi, H. Sun, Y. W. Wu, G. Triola, H. Waldmann, R. S. Goody *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 9417.
- ²¹ S. D. Tilley, M. B. Francis *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1080.
- ²² S. Chen, X. Li, H. Ma *ChemBioChem* **2009**, 10, 1200.
- ²³ J. Gavriluk, H. Ban, M. Nagano, W. Hakamata, C. F. Barbas, 3rd *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23, 2321.
- ²⁴ G. B. Cserép, A. Herner, O. S. Wolfbeis, P. Kele *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 5776.
- ²⁵ H. Ban, M. Nagano, J. Gavriluk, W. Hakamata, T. Inokuma, C. F. Barbas, 3rd *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24, 520.
- ²⁶ J. Morales-Sanfrutos, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4039.
- ²⁷ N. Toda, S. Asano, C. F. Barbas, 3rd *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 12592.
- ²⁸ J. M. Chalker, G. J. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis *Chem. Asian J.* **2009**, 4, 630.
- ²⁹ S. C. Alley, D. R. Benjamin, S. C. Jeffrey, N. M. Okeley, D. L. Meyer, R. J. Sanderson, P. D. Senter *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 759.
- ³⁰ D. Lin, S. Saleh, D. C. Liebler *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 2361.
- ³¹ B. Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponste, J. Tien, S. F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwowski, R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 184.

- 32 J. Morales-Sanfrutos, J. Lopez-Jaramillo, M. Ortega-Munoz, A. Megia-Fernandez, F. Perez-Balderas, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 667.
- 33 M. Morpurgo, F. M. Veronese, D. Kachensky, J. M. Harris *Bioconjug. Chem.* **1996**, 7, 363.
- 34 H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 14846.
- 35 E. Saxon, C. R. Bertozzi *Science* **2000**, 287, 2007.
- 36 E. M. Sletten, C. R. Bertozzi *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 6974.
- 37 C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, S. Bräse *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4840.
- 38 S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. van Hest *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 8806.
- 39 J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann *Chem. Ber.* **1967**, 100, 60.
- 40 W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 2832.
- 41 W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9654.
- 42 R. K. Lim, Q. Lin *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 828.
- 43 P. An, Z. Yu, Q. Lin *Org. Lett.* **2013**, 15, 5496.
- 44 Z. Yu, T. Y. Ohulchanskyy, P. An, P. N. Prasad, Q. Lin *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 16766.
- 45 C. P. Ramil, Q. Lin *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 89.
- 46 R. Huisgen *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357.
- 47 V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2596.
- 48 C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.
- 49 V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 9879.
- 50 C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, 51, 5852.
- 51 D. Soriano Del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16893.
- 52 N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046.
- 53 J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 16793.
- 54 X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G. J. Boons *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 2253.
- 55 M. F. Debets, J. C. van Hest, F. P. Rutjes *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 6439.
- 56 A. Hantzsch, M. Lehmann *Chem. Ber.* **1900**, 33, 3668.
- 57 C. J. Tai, L. Yang, N. L. Allinger *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11906.
- 58 R. A. Carbon, R. V. Lindsey *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 4342.
- 59 J. Sauer, G. Heinrichs *Tetrahedron Lett.* **1966**, 41, 4979.
- 60 M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13518.
- 61 N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 2297.
- 62 A. C. Knall, C. Slugovc *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 5131.
- 63 M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 9646.
- 64 D. C. Rideout, R. Breslow *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7816.
- 65 G. Graziano *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, 17, 100.
- 66 J. W. Wijnen, S. Zavarise, J. B. F. N. Engberts, M. Charton *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2001.
- 67 K. E. Beatty *Mol. Biosyst.* **2011**, 7, 2360.
- 68 M. Grammel, H. C. Hang *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 475.
- 69 K. Lang, J. W. Chin *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4764.
- 70 H. C. Hang, J. P. Wilson, G. Charron *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 699.

- ⁷¹ S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi *Science* **2008**, 320, 664.
- ⁷² M. A. Kostiuik, M. M. Corvi, B. O. Keller, G. Plummer, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, G. Rajaiah, J. R. Falck, L. G. Berthiaume *FASEB J.* **2008**, 22, 721.
- ⁷³ P. Kele, X. Li, M. Link, K. Nagy, A. Herner, K. Lorincz, S. Beni, O. S. Wolfbeis *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 3486.
- ⁷⁴ K. Nagy, E. Orbán, S. Bösze, P. Kele *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 773.
- ⁷⁵ T. Ehrenschwender, B. R. Varga, P. Kele, H. A. Wagenknecht *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 1761.
- ⁷⁶ J. Boor, A. M. T. Finch *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1971**, 9, 249.
- ⁷⁷ K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang *Org. Lett.* **2004**, 6, 4603.
- ⁷⁸ A. Balogh, K. Horváti, G. Mező, L. Derzbach, B. Szebeni, L. Nagy, J. Prechl, B. Vásárhelyi, F. Hudecz, S. Bösze *J. Pept. Sci.* **2009**, 15, 285.
- ⁷⁹ A. Herner, I. Nikic, M. Kallay, E. A. Lemke, P. Kele *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 3297.
- ⁸⁰ A. Herner, G. Estrada Girona, I. Nikic, M. Kallay, E. A. Lemke, P. Kele *Bioconjug. Chem.* **2014**, 25, 1370.
- ⁸¹ M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22, 2263.
- ⁸² J. F. Geldard, F. Lions *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 318.
- ⁸³ M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. J. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox *Gaussian 09, Revision D.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, **2009**.
- ⁸⁴ B. R. Varga *PhD Dissertation*, Eötvös Loránd University, **2014**.
- ⁸⁵ B. R. Varga, M. Kállay, K. Hegyi, S. Béni, P. Kele *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 822.
- ⁸⁶ M. Royzen, G. P. Yap, J. M. Fox *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3760.
- ⁸⁷ M. Nuzzolo, A. Grabulosa, A. M. Z. Slawin, N. J. Meeuwenoord, G. A. van der Marel, P. C. J. Kamer *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 3229.
- ⁸⁸ M. S. Goncalves *Chem. Rev.* **2009**, 109, 190.
- ⁸⁹ J. S. Wu, W. M. Liu, X. Q. Zhuang, F. Wang, P. F. Wang, S. L. Tao, X. H. Zhang, S. K. Wu, S. T. Lee *Org. Lett.* **2007**, 9, 33.
- ⁹⁰ A. S. Klymchenko, V. G. Pivovarenko, T. Ozturk, A. P. Demchenko *New J. Chem.* **2003**, 27, 1336.
- ⁹¹ D. F. Eaton *J. Photochem. Photobiol. B* **1988**, 2, 523.
- ⁹² R. B. Weiss *Semin. Oncol.* **1992**, 19, 670.
- ⁹³ V. Behal *Adv. Appl. Microbiol.* **2000**, 47, 113.
- ⁹⁴ E. Lavie, D. L. Hirschberg, G. Schreiber, K. Thor, L. Hill, I. Hellstrom, K.-E. Hellstrom *Cancer Immunol. Immunother.* **1991**, 33, 223.
- ⁹⁵ P. Schlage, G. Mező, E. Orbán, S. Bösze, M. Manea *J. Control. Release* **2011**, 156, 170.
- ⁹⁶ F. Hudecz, Z. Bánóczy, G. Csík *Med. Res. Rev.* **2005**, 25, 679.
- ⁹⁷ E. Orbán, G. Mező, P. Schlage, G. Csík, Z. Kulic, P. Ansorge, E. Fellingner, H. M. Möller, M. Manea *Amino Acids* **2011**, 41, 469.
- ⁹⁸ A. V. Schally, A. Nagy *Trends Endocrinol. Metab.* **2004**, 15, 300.

- ⁹⁹ I. T. Magrath *Int. J. Cancer* **1994**, *56*, 163.
- ¹⁰⁰ C. Stubinitzky, G. B. Cserép, E. Batzner, P. Kele, H. A. Wagenknecht *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11218.
- ¹⁰¹ A. Demeter, T. Bérces, K. A. Zachariasse *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 4611.
- ¹⁰² A. Sinicropi, W. M. Nau, M. Olivucci *Photochemical & Photobiological Sciences* **2002**, *1*, 537.
- ¹⁰³ T. Sakamoto, S. Kaneda, S. Nishimura, H. Yamanaka *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1985**, *33*, 565.